

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1968
tom 14
nr 1

KWARTALNIK



<http://rcin.org.pl>

INFORMACJA DLA AUTORÓW

Postępy Biochemii publikują artykuły referatowe ze wszystkich dziedzin biochemii nie drukowane w innych czasopismach. Artykuły drukowane w *Postęпах Biochemii* nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych czasopismach. Artykuły są honorowane wg ustalonych stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek pracy; żądanie dalszych odbitek (płatnych) należy zgłosić pisemnie nadsyłając pracę. Autora obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich ponosi autor.

Redakcja zastrzega sobie możliwość wprowadzenia skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy.

Forma maszynopisu. Maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy podsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm po lewej i ok. 1 cm po prawej stronie oraz z numeracją stron. Na pierwszej stronie należy zamieścić tylko: imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, ich stopnie i tytuły naukowe wraz z nazwami placówek naukowych, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz omówienie tematu pracy w języku angielskim (najwyżej 5 wierszy maszynopisu).

Rozdziały w tekście należy oznaczyć numeracją rzymską a podrozdziały — arabską. Tytuły nie wydzielone z tekstu nie powinny być numerowane.

W tekście nie należy zamieszczać żadnych tablic, rysunków, schematów i wzorów. W żądanym miejscu należy pozostawić wolny wiersz i oznaczyć: Tablica 1, Rys. 1, Schemat 1 lub liczbą rzymską w nawiasie — numer odpowiedniego wzoru. W tekście należy odwołać się do numeracji wzoru po słownym wymienieniu związku, np.: kwas glutaminowy (I).

Powołując się na literaturę należy podać w tekście, w nawiasie, kolejny numer pozycji w spisie literatury.

Załączniki do tekstu. Każdy załącznik należy dołączyć na oddzielnej kartce, opatrzonej kolejnym numerem odpowiadającym użytemu w tekście np. Tablica 1, Wzór I, Rys. 1 lub Schemat 1. Fotografie i wykresy należy oznaczyć jako rysunki. Wszystkie załączniki należy oznaczyć u góry nazwiskiem autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tablica powinna zawierać nagłówek opisujący jej treść, jej rubryki powinny być zaopatrzone w odpowiedni tytuł.

Podpisy i objaśnienia pod rysunkami i schematami powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Oznaczenia, których nie można napisać na maszynie należy wyraźnie nanieść czarnym tuszem. W fotografiach i wykresach należy oznaczyć „górną” i „dół”.

Literatura. Wykaz literatury należy wypisać oddzielnie, na ostatnich stronach maszynopisu, w alfabetycznej kolejności nazwisk autorów.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIŁKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1968
tom XIV
zeszyt 1

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: B. Filipowicz (Łódź)
Członkowie: J. Chmiel (Poznań), W. Gajewski (Warszawa),
Z. Kasprzyk (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen
(Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań), J. Trojanowski
(Lublin)

Komitety Redakcyjne

Redaktor — Zofia Lasota

Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Warszawa 12, ul. Rakowiecka 36
tel. 44-52-01, wewn. 506

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1967

Nakład 1900 (1744+156)	Podpisano do druku w styczniu 1968
Ark. wyd. 13,5; ark. druk. 10,25+3 wkl. kred.	Oddano do składania 19.X.1967
Papier druk. sat. kl. V, 70 × 100	Zam. nr 1748. T-75.
Cena zł 20.—	Druk ukończono w styczniu 1968

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

NINA WOŁOSOWICZ *, LEOKADIA JAROSZEWICZ **,
STEFAN NIEWIAROWSKI ***

Biochemia układu fibrynolitycznego osocza krwi

The Biochemistry of Fibrinolytic System of Blood Serum

The activation and inhibition of fibrinolytic system as well as some physiological aspects of fibrinolysis are discussed.

Proteolizę fibryny we krwi lub roztworach pod wpływem enzymów obecnych w osoczu określa się mianem fibrynolizy. Na fibrynolityczne i proteolityczne właściwości krwi zwrócono uwagę pod koniec XIX wieku. W roku 1893 Dastre (74) zauważył, że skrzepy krwi mogą być upłynione przez niektóre paciorkowce, a 10 lat później Delezenne i Pózerski (77) opisali zjawisko hydrolizy kazeiny i żelatyny przez surowicę krwi. W tym samym czasie Hedin (96) frakcjonując białka surowicy za pomocą siarczanu amonu stwierdził we frakcji globulinowej obecność proteazy silnie trawiącej pepton, zaś we frakcji albuminowej obecność inhibitora hamującego działanie tego enzymu. W roku 1908 Nolf (181) wysunął pogląd, że fibrynoliza jest spowodowana działaniem czynników proteolitycznych, który nie został wówczas powszechnie przyjęty. W latach 1922—1937 fibrynolizą zajmował się polski badacz Rozenmann (211, 213), który poruszył zagadnienia jej fizjologicznej roli, jej związku z krzepnięciem krwi oraz roli inhibitorów fibrynolizy. Uważał on, że układ fibrynolityczny osocza składa się z enzymu — trombolizyny i z inhibitora — tromboliginy. W latach 1929—1936 rosyjscy badacze Bogomołowa, Kartawowa (47) i Yudin (252) stwierdzili dużą aktywność fibrynolityczną we krwi osób zmarłych

* Dr. st. asystent Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Białymstoku.

** Dr. adiunkt Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Białymstoku.

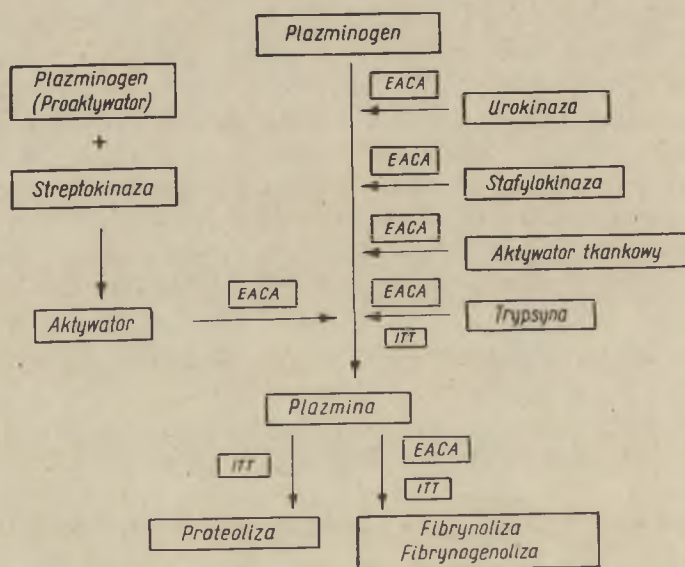
*** Doc. dr med. kierownik Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Białymstoku.

Wykaz używanych skrótów: SK — streptokinaza, EACA — kwas ϵ -aminokapronowy, TAME — ester metylowy tosyloargininy, LEE — ester etylowy lizyny, AMCHA — kwas 1,4-aminometylocykloheksanokarboksylowy, PAMBA — kwas p-aminometylobenzoesowy, SBTI — inhibitor trypsyny z soi, ITT — inhibitor trypsyny z trzustki.

śmiercią nagłą. W roku 1933 Tillet i Garner (235) wyodrębnili z przesączu hodowli paciorkowców streptokinazę, substancję powodującą fibrynolizę skrzepów. Jednak dopiero w latach czterdziestych Milstone (163), Kaplan (115) oraz Christensen i MacLeod (62) wyjaśnili, że streptokinaza nie ma właściwości fibrynolitycznych, powoduje natomiast aktywację plazminogenu. Aktywacja przekształca nieczynny plazminogen w czynny enzym proteolityczny — plazminę, której zasadniczą funkcją jest rozpuszczanie skrzepów osocza krwi. Plazmina powoduje hydrolizę fibrynogenu, fibryny i niektórych innych białek osocza krwi. Trawi ona także kazeinę i żelatynę (220) oraz estry lizyny i argininy (145, 208, 238). Niektóre białka, na przykład kolagen, nie są trawione przez plazminę (128). Plazminogen może być aktywowany do plazminy przez różne aktywatory *in vivo* i *in vitro*. Aktywność proteolityczna i fibrynolityczna plazminy jest hamowana przez szereg różnych inhibitorów. Istnieją również swoiste inhibitory aktywacji plazminogenu na przykład kwas ϵ -aminokapronowy (EACA).

Układ fibrynolityczny wraz z jego aktywatorami i inhibitorami przedstawiono na rysunku 1.

Plazminogen można oznaczać pośrednio aktywując go do plazminy



Rys. 1. Układ fibrynolityczny osocza. Na schemacie uwzględniono działanie inhibitorów fibrynolizy: kwasu ϵ -aminokapronowego (EACA) i inhibitora trzustkowego trypsyny (ITT)

Definicje i synonimy: Plazmina — fibrynolizyna — aktywna forma proteazy krwi. Plazminogen — profibrynoliza — prekursor plazminy. Aktywatory plazminogenu — czynniki działające bezpośrednio na plazminogen, zmieniające go na czynną plazminę. Proaktywator — substancja reagująca ze streptokinazą, w wyniku czego powstaje aktywator plazminogenu. Proaktywator jest prawdopodobnie identyczny z plazminogenem. Inhibitory — substancje hamujące konwersję plazminogenu na plazminę lub działanie plazminy na fibrynogen i fibrynę.

i oznaczając jej aktywność fibrynolityczną, proteolityczną lub estera-zową (zależnie od użytego substratu). Miarą aktywności plazminy, plazminogenu, aktywatorów i inhibitorów jest najczęściej czas lizy fibrynowego skrzepu. Można mierzyć czas lizy skrzepu rozcieńczonej pełnej krwi (43) lub osocza (86) względnie czas fibrynolizy euglobulin osocza (118, 134). Stosuje się także pomiar powierzchni strawionego pola fibryny na płytkach fibrynowych (21, 144), spektrofotometryczne oznaczenia fibrynolizy (240) i technikę tromboelastograficzną (99, 117). Mimo mniejszej swoistości kazeiny jako substratu, szeroko stosowana jest, zwłaszcza do oceny oczyszczonych preparatów, metoda kazeinolityczna, powtarzalna i dokładniejsza od metod fibrynolitycznych. Szybkość hydrolizy kazeiny jest proporcjonalna do zawartości plazminy. Miarą aktywności jest ilość produktów hydrolizy rozpuszczalnych w kwasie tróchloroctowym. Ilość uwolnionych peptydów można oznaczać kolorymetrycznie lub spektrofotometrycznie, najczęściej przy użyciu odczynnika Folin-Ciocalteu reagującego z tyrozyną. Istnieje wiele modyfikacji metody kazeinolitycznej (15, 78, 85, 97, 109, 162, 167, 170, 200, 218, 243).

Do oznaczania aktywności plazminogenu i plazminy stosuje się także syntetyczne substraty jak estry argininy i lizyny (208, 238). Esterolityczna aktywność plazminy nie jest jednak równoległa do aktywności proteolitycznej (154). Inne enzymy na przykład trombina także posiadają aktywność estera-zową. Estera-zowej metody można używać w badaniach kinetycznych jedynie oczyszczonych układów (220).

I. Preparatyka plazminogenu i plazminy

Plazminogen jest białkiem wytrącającym się we frakcji euglobulinowej z rozcieńczonego osocza w pH 5,3 lub przy 30% nasyceniu siarczanem amonu z osocza nierozcieńczonego. Około 20 lat temu uzyskano z osocza i surowicy krwi częściowo oczyszczone preparaty plazminogenu o niskiej swoistej aktywności (81, 152, 210). W 1949 roku Remmert i Cohen (200) otrzymali 136—165-krotnie oczyszczony preparat plazminogenu z osocza krwi ludzkiej, stosując precypitację w pH 5,3 i adsorpcję na kaolinie. Obserwując zachowanie się preparatów plazminogenu w czasie oczyszczania wyrazili oni przypuszczenie, że plazminogen ma tendencję do koprecypitacji z innymi białkami, co może znacznie utrudniać jego oczyszczenie. Tendencja do koprecypitacji wyraźnie spada przy niskich wartościach pH , przy których ludzki plazminogen jest rozpuszczalny i dosyć stabilny. Metodę opartą na ekstrakcji plazminogenu 0,2N H_2SO_4 z III frakcji Cohna opracowali Christensen i Smith (63) uzyskując 250-krotnie oczyszczony preparat. Ulepszył ją Kline (123), uzyskując 425-krotny wzrost aktywności preparatów plazminogenu w porównaniu z surowicą. Metoda Kline'a była przez wiele lat standardową metodą otrzymywania wysoko oczyszczonych preparatów ludzkiego

plazminogenu; opublikowano wiele jej modyfikacji (66, 94, 184, 218, 224). Uzyskiwane preparaty były słabo rozpuszczalne w pH 4 do 9, prawdopodobnie w wyniku denaturującego działania stosunkowo silnego kwasu (pH 2) lub zasady (pH 11) stosowanych podczas preparatyki.

Do oczyszczania plazminogenu próbowano stosować i inne metody na przykład metodę frakcjonowania rivanolem (231). Alkjaersig i wsp. (14) i Hagan (95) opisali wpływ różnych ω -aminokwasów na rozpuszczanie plazminogenu w pH 5,5. Wykorzystując ich obserwacje Kline i Fishman (125) zmodyfikowali oryginalną metodę Kline'a (123) stosując wytrącanie białek zanieczyszczających plazminogen w pH 5,5 w obecności lizyny i uzyskali preparaty o wyższej specyficznej aktywności i wyniki bardziej powtarzalne.

Wallen i Bergström (242) zastosowali chromatografię na DEAE-celulozie do oczyszczania plazminogenu używając do elucji plazminogenu z kolumny buforu zawierającego lizynę lub EACA. Uzyskany produkt był rozpuszczalny w obojętnym pH . Metodę tę zmodyfikował Wallen (243, 244) wprowadzając frakcjonowanie metanolem i siarczanem amonu w pH 4,0. Częściowo oczyszczone preparaty plazminogenu chromatografowano następnie na kolumnie z CM- lub TEAE-celulozą. Preparaty po TEAE-celulozie sączone przez kolumnę Sephadex G-200 używając buforu octanowego o pH 4,5. Derechin i wsp. (79) wymywali plazminogen z kolumny z DEAE-celulozą buforem zawierającym lizynę, a Cohly i Shulman (67) stosowali w tym celu 0,04M octan amonu z 0,01M lub 0,05M roztworami lizyny. Do elucji plazminogenu z kolumny stosowano także 6M mocznik w obecności buforu fosforanowego i lizyny. W tych warunkach odzyskiwano całkowicie białko, jednak aktywność właściwa uzyskanych frakcji była niska.

Alkjaersig (17) opisała dwie metody oczyszczania plazminogenu ludzkiego: na kolumnie z DEAE-celulozą i z DEAE Sephadex. Aktywność preparatów uzyskanych drugą metodą była nieco wyższa i wynosiła od 180 do 230 jednostek kazeinowych na mg tyrozyny. Preparaty te w porównaniu z preparatami otrzymanymi przez kwaśną ekstrakcję były lepiej rozpuszczalne w obojętnym pH i bardziej stabilne. Porównanie własności fizycznych tych preparatów sugeruje, że zależnie od użytej metody wyodrębniania plazminogenu, może on występować w trzech strukturalnych formach.

Wysoko oczyszczone preparaty plazminogenu i plazminy ludzkiej uzyskali Robbins i Summaria (204). Otrzymane metodą Kline'a preparaty poddali oni chromatografii na kolumnie DEAE Sephadex, używając buforu tris-lizyna o pH 9. Wymywanie plazminogenu ze wzrostem siły jonowej dawało około 900-krotne oczyszczenie w porównaniu z wyjściową surowicą lub oszczem. Plazminę uzyskiwano przez aktywację proenzymu ślaskami urokinazy w glicerolu i rozdział na kolumnie DEAE Sephadex. Aktywność właściwa oczyszczonych preparatów

plazminogenu i plazminy wynosiła 19,5—21,4 jednostek kazeinowych na mg białka, lub 123 do 140 na mg azotu. Wydaje się, że najlepiej oczyszczone dotychczas preparaty plazminogenu i plazminy ludzkiej uzyskali Robbins i wsp. (205), drogą precypitacji w pH 6,2 i chromatografii na kolumnie *DEAE Sephadex* a następnie *Sephadex G-100*.

Większość opublikowanych prac dotyczy oczyszczania plazminogenu ludzkiego. Oczyszczano także plazminogen wołowy (38, 68, 73, 159, 253). Stosowano w tym celu wysalanie siarczanem amonu i wytrącanie w pH 5,3 (253), precypitację siarczanem amonu i chromatografię na kolumnie z fosforanem wapnia (73) oraz chromatografię na kolumnie z *DEAE* celulozą i precypitację buforem fosforanowym o pH 7,6 (68) a także elektroforezę ciągłą (160).

Do oczyszczania plazminogenu wołowego stosowano także metodę Kline'a (175). Bergström (38, 40) uzyskał wysoko oczyszczony plazminogen wołowy (około 300-krotnie w porównaniu z osoczem) drogą precypitacji w pH 5,3, ekstrakcji plazminogenu EACA, frakcjonowaniu metanolem i siarczanem amonu oraz chromatografii na *CM*-celulozie. Chan i Mertz (58) wyodrębnili wysoko oczyszczone preparaty plazminogenu wołowego i ludzkiego stosując kolumny *Sephadex G-200*.

II. Własności plazminogenu i plazminy

Własności fizyczne i chemiczne oczyszczonych preparatów plazminogenu i plazminy zależą od stosowanych metod izolowania. Plazminogen uzyskany po kwaśnej ekstrakcji jest prawie nierozpuszczalny w buforze fosforanowym w obojętnym pH , a wyodrębniony bez zastosowania kwasów — rozpuszczalny (17). W ultrawirówce wysoko oczyszczone preparaty plazminogenu otrzymywane za pomocą kwaśnej ekstrakcji (125) a także chromatografii kolumnowej (205) dawały pojedynczy szczyt białkowy, jednak w badaniach elektroforetycznych na żelu skrobiowym i poliakrylamidzie wykazywały heterogenność (60, 205). Plazminogen i plazmina są β -globulinami, przy czym plazminogen jest prawdopodobnie β_2 -globuliną, a plazmina — β_1 -globuliną (204). Plazminogen i plazmina aktywowana urokinazą lub streptokinazą są immunologicznie identyczne. Ruchliwość elektroforetyczna plazminogenu i plazminy jest zbliżona, z tym że ładunek plazminogenu jest bardziej ujemny (205). Slotta i Gonzales (227) badając własności aktywnego plazminogenu wyodrębnionego z III-ciej frakcji Cohna drogą absorpcji na fosforanie wapnia stwierdzili, że jest on glikooglobuliną zawierającą około 92% białka, 5% heksozy, 2,8% heksozoaminy i 0,6% kwasu sialowego.

Plazminogen zawiera ugrupowania -S-S-, nie ma natomiast wolnych grup -SH. Działanie kwasami powoduje przejście plazminogenu bez straty aktywności w pseudoglobulinę, polegające prawdopodobnie na zmianie struktury drugo- i trzeciorzędowej. Dane dotyczące ciężaru

cząsteczkowego plazminogenu i plazminy różnią się. Ciężar cząsteczkowy plazminogenu otrzymanego metodą Kline'a obliczony na podstawie współczynników sedymentacji i dyfuzji wynosi 143 000 a plazminy 108 000 (223). Punkt izoelektryczny uzyskanego plazminogenu leży w pH 5,6, a plazminy w pH 6,2. Alkjaersig i wsp. (11, 13) uważają, że mechanizm aktywacji plazminogenu do plazminy jest autokatalityczny i połączony z uwolnieniem peptydów, a więc podobny do aktywacji tryptynogenu. Shulman i Rife (225) przeprowadzili badania nad peptydem uwolnionym w czasie aktywacji plazminogenu streptokinazą. Ten tak zwany plazmino-peptyd jest mieszaniną trzech składników A, B i C o tym samym współczynniku sedymentacji a różnej ruchliwości elektroforetycznej. W czasie aktywacji plazminogenu bez streptokinazy zostaje także uwolniony peptyd lecz znacznie mniejszy (202). Według Davies i Englerta (75) ciężar cząsteczkowy plazminogenu wynosi 83 800. Jeżeli odszczepiany w czasie aktywacji peptyd stanowiłby 10% cząsteczki plazminogenu, to ciężar cząsteczkowy plazminy wynosiłby około 75 000 (127). Jednakże według Robbins i Summaria (205), ciężar cząsteczkowy plazminogenu i plazminy jest taki sam ($89\,000 \pm \pm 1\,500$), a zatem jeżeli nawet w czasie aktywacji plazminogenu przez streptokinazę lub urokinazę uwalniają się peptydy, to ich ciężar cząsteczkowy nie może być większy niż 3000—4000. Według tych badaczy w czasie konwersji plazminogenu do plazminy zachodzi prawdopodobnie zmiana trzeciorzędowej struktury, na co wskazuje wzrost współczynnika sedymentacji i współczynnika dyfuzji, chociaż ciężar cząsteczkowy pozostaje ten sam. Na zmianę kształtu cząsteczki wskazuje również zmiana współczynnika tarcia. Analiza aminokwasów plazminogenu i plazminy aktywowanej streptokinazą wykazuje niewielkie różnice. Większe różnice wykazuje plazmina aktywowana urokinazą. Zawiera ona mniej waliny, leucyny, izoleucyny i fenyloalaniny (8—15%), a więcej seryny i treoniny (8—10%) niż plazminogen. Stała Michaelisa plazmin aktywowanych urokinazą i streptokinazą wynosi 0,02M estru metylowego *p*-tosylo-L-argininy (TAMe). Stała szybkości V wynosi $1\,700 \pm 200$ moli/min/mol enzymu.

Chan i Mertz (59) zbadali szczegółowo produkty aktywacji wołowego plazminogenu za pomocą urokinazy. Sugerują oni, że natywny plazminogen przechodzi w czasie aktywacji w plazminogen zmieniony, a ten z kolei aktywuje się na plazminę I o stosunkowo niskiej aktywności. Wszystkie te trzy substancje mają ten sam ciężar cząsteczkowy — 80 000. Plazmina I przechodzi w postać aktywną — plazminę II o ciężarze cząsteczkowym 62 000, ta z kolei przechodzi w niaktywny peptyd A o ciężarze cząsteczkowym 43 000.

Wysoko oczyszczony plazminogen wołowy poddany elektroforezie na żelu skrobiowym wykazuje jedną lub dwie frakcje, obie z aktywnością plazminogenową (38). Ciężar cząsteczkowy wołowego plazminogenu wy-

nosi 84 000, a punkt izoelektryczny leży w pH około 8. Sekwencja aminokwasów od strony N-końcowego aminokwasu jest następująca: Asp, Leu (lub Ileu), Leu (lub Ileu), Asp (39). Aktywacja homogennej frakcji plazminogenu wołowego przez urokinazę prowadzi do powstawania dwóch frakcji o różnej ruchliwości elektroforetycznej na żelu skrobiowym, z których jedna odpowiada ruchliwości plazminy (39). Obecność dwóch frakcji na żelu skrobiowym stwierdzili również Chan i Mertz (57) po elektroforezie plazminogenu wołowego i ludzkiego aktywowanego urokinazą.

III. Aktywacja plazminogenu do plazminy

Istnieje kilka mechanizmów aktywacji plazminogenu do plazminy. Oczyszczony plazminogen w buforze o pH bliskim obojętnego ulega słabej spontanicznej aktywacji. Roztwór glicerolu katalizuje tę reakcję oraz stabilizuje otrzymaną plazminę. Optymalne warunki dla spontanicznej aktywacji plazminogenu uzyskuje się w roztworze 50% glicerolu, w buforze fosforanowym o pH 7,6 w temperaturze $37^{\circ}C$ (11). Reakcji towarzyszy przyrost tyrozyny rozpuszczalnej w kwasie trójchlorooctowym. Nieoczyszczony plazminogen ulega aktywacji pod wpływem chloroformu (152). Zarówno oczyszczony, jak i nieoczyszczony plazminogen ulega aktywacji na drodze enzymatycznej lub przy udziale aktywatorów specyficznych. Aktywatory specyficzne można podzielić na dwie grupy: aktywatory naturalne występujące w organizmie (aktywatory osoczowe i tkankowe, aktywator z moczu — urokinaza oraz trypsyna z soku trzustkowego) i aktywatory pochodzenia bakteryjnego (streptokinaza i stafilokinaza).

Poza tym wiele związków chemicznych (benzen, mocznik, naftalen, uretan, niektóre kwasy tłuszczowe, cyjanek potasu) powoduje nieenzymatyczną aktywację plazminogenu do plazminy. Prawdopodobnie mechanizm działania wielu tych związków polega na inaktywacji antyplazminy i antytrypsyny osoczowej (119, 120), co umożliwia samorzutną aktywację plazminogenu.

1. Aktywacja plazminogenu z udziałem aktywatorów naturalnych

Aktywacja plazminogenu *in vivo* zachodzi pod wpływem endogennych aktywatorów osoczowych i tkankowych. Mechanizm aktywacji plazminogenu we krwi krążącej nie jest dostatecznie poznany. Bliżej scharakteryzowane są aktywatory tkankowe pochodzące z serca, wątroby, płuc, śledziony i nerek (1, 10, 20, 23, 33, 141, 157, 189, 209). Wysoko oczyszczone preparaty aktywatora tkankowego plazminogenu z serca świni uzyskali Mc Call i Kline (157) oraz Bachman i wsp. (34). Mechanizm działania tych aktywatorów jest enzymatyczny.

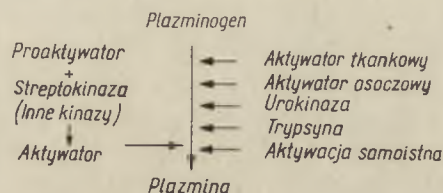
Silnym aktywatorem plazminogenu jest urokinaza. Na fibrynolityczne właściwości moczu zwrócono uwagę w początkach lat pięćdziesiątych (22, 228, 247). W latach następnych próbowano wyodrębnić i oczyścić urokinazę (49, 194, 195) oraz badano kinetykę aktywacji plazminogenu przez urokinazę (121). Reakcja ta jest reakcją enzymatyczną I rzędu. Jej optimum pH leży przy pH około 9. Sgouris i wsp. (217, 219) otrzymali znacznie oczyszczony preparat urokinazy pozbawiony własności pirogennych, a Lesuk i wsp. (147) uzyskali preparat krystaliczny i ustalili, że ciężar cząsteczkowy urokinazy oznaczony w ultrawirówce wynosi 53 000. Natomiast Burges i wsp. (55) za pomocą sączenia na żelu *Sephadex* G-75 i G-100 uzyskali wartość 35 000. Urokinaza ludzka może aktywować plazminogen ludzki, wołowy oraz z innych gatunków zwierząt. Hydrolizuje ona syntetyczne estry aminokwasów (153, 222). Robbins i Summaria (205a) uważają, iż podczas aktywacji plazminogenu urokinazą zachodzi hydroliza wiązania peptydowego pomiędzy arginina i waliną i że aktywna plazmina składa się z dwóch monomerów powiązanych mostkiem S-S. Sugerują oni, iż aktywacja plazminogenu za pomocą innych aktywatorów może mieć przebieg podobny.

Trypsyna aktywuje plazminogen jedynie w układach oczyszczanych (108). W osoczu aktywacja ta hamowana jest przez antytrypsynę. Ostatnio Engel i wsp. (82) stwierdzili, że również trombina ma zdolność aktywacji plazminogenu do plazminy, co może być jednym z mechanizmów warunkujących wzmożenie aktywacji fibrynolizy w następstwie wewnątrznaczyniowego krzepnięcia. Dotychczas nie wyjaśniono, czy aktywacja fibrynolizy przebiegająca w następstwie uczynienia czynnika XII i XI pod wpływem kontaktu z powierzchniami (105, 174) zależy od aktywacji plazminogenu. Według Kleniewskiego (122) aktywny czynnik kontaktu powoduje zniszczenie inhibitora fibrynolizy.

2. Aktywacja plazminogenu z udziałem specyficznych aktywatorów pochodzenia bakteryjnego

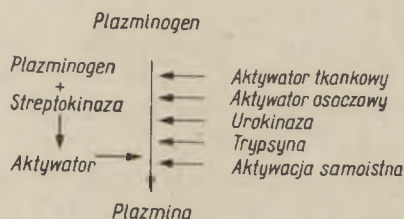
Streptokinaza nie wykazuje własności proteolitycznych w stosunku do fibryny, kazeiny, żelatyny i nie hydrolizuje syntetycznych estrów aminokwasów (206), powoduje natomiast swoistą aktywację ludzkiego plazminogenu do plazminy (161), czemu towarzyszy przyrost azotu pozabiałkowego (132). Reakcję aktywacji hamują specyficzne inhibitory konwersji plazminogenu: EACA (4, 5, 14), kwas 1,4-aminometylocykloheksanokarboksylowy (AMCHA) i kwas *p*-aminometylobenzoowy (PAMBA) (150, 151, 190), aldehydy (232) oraz syntetyczne estry np. TAME (207). Porównanie reakcji fibrynolizy w osoczu wołowym i ludzkim pod wpływem streptokinazy stanowiło punkt wyjściowy kilku teorii aktywacji plazminogenu. Müllert z i Lassen (166) stwierdzili iż plazminogen ludzki pod wpływem streptokinazy aktywuje się szybko, podczas gdy aktywacja plazminogenu wołowego przebiega bardzo wolno, a przyspiesza ją dodatek niewielkich ilości osocza lub euglobulin ludzkich.

Müllertz, Lassen i Astrup (28, 166, 167, 168) postulowali mechanizm dwustopniowej aktywacji plazminogenu. Założyli oni istnienie we krwi ludzkiej dwóch prekursorów fibrynolitycznych: proaktywatora i plazminogenu. Zdaniem ich proaktywator w reakcji ze streptokinazą przekształca się w czynny aktywator, a ten przekształca z kolei plazminogen w plazminę bez względu na pochodzenie gatunkowe (Rysunek 2). Dotychczas poza reakcją ze streptokinazą nie stwierdzono innej



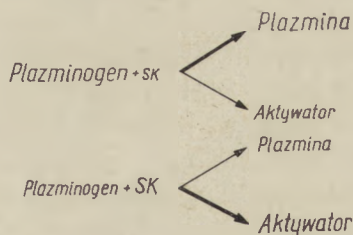
Rys. 2. Hipotetyczny schemat aktywacji według Müllertza i Astrupa (28, 166)

możliwości przemiany „proaktywatora” Müllertza w aktywator. Odmienny pogląd wyrazili Ablondi (3) oraz Kline i Fishman (124). Postulowali oni, że plazminogen daje kompleks ze streptokinazą, tworząc aktywator o własnościach proteolitycznych, który działa na plazminogen (Rysunek 3). Kline (126) stwierdził, że istotnie plazminogen



Rys. 3. Hipotetyczny schemat aktywacji fibrynolizy według Kline'a i Fischmana (124)

ludzki w obecności małej ilości streptokinazy wytwarza nieznaczne ilości aktywatora, aktywującego nadmiar plazminogenu do plazminy. Przy nadmiarze streptokinazy powstaje nieznaczna ilość plazminy i duża ilość aktywatora (Rysunek 4).



Rys. 4. Interakcja plazminogenu ze streptokinazą według Kline'a (126)

Oporność wołowego plazminogenu na działanie streptokinazy można tłumaczyć obecnością swoistych inhibitorów aktywacji. Niewiarowski i Latałło (175) wykazali, że wysoko oczyszczone preparaty plazminogenu wołowego ulegają aktywacji streptokinazą. Zbadali oni osocza szeregu zwierząt określając podatność ich układu fibrynolitycznego na aktywację za pomocą mieszaniny streptokinazy i plazminy ludzkiej. Stwierdzili, że streptokinaza aktywuje bezpośrednio układy fibrynolityczne człowieka, małpy, psa i kota. Mieszanina streptokinazy i plazminy ludzkiej aktywuje układy fibrynolityczne wołu, barana, świni, konia, królika, myszy, szczura, chomika i świnki morskiej. Oporne na aktywację zarówno streptokinazą jak i mieszaniną streptokinazy z ludzką plazminą są układy fibrynolityczne kury, kaczki, indyka, ryby i żaby.

Markus i Werkheizer (155) wysunęli hipotezę, która jest niejako syntezą różnych poprzednio sformułowanych poglądów. Według nich proaktywator I obecny w osoczu ludzkim wytwarza pod wpływem streptokinazy aktywator I zdolny do aktywacji plazminogenu zarówno ludzkiego jak i wołowego. Poza tym plazminogen ludzki ze streptokinazą (SK) daje kompleks SK-plazminogen, zdolny do aktywacji plazminogenu wołowego. Kompleks ten pod wpływem aktywatora I przechodzi w kompleks SK-plazminę, aktywujący plazminogen wołowy i mający właściwości esterazowe i niską aktywność proteolityczną. Mieszanina SK-plazminogenu i SK-plazminy daje aktywator II obdarzony właściwościami obu jej składników.

Ostatnio Ts'a'o i Kline (239) stoją na stanowisku, iż streptokinaza wytwarza kompleks zarówno z plazminogenem jak i z plazminą ludzką i że oba te kompleksy aktywują plazminogen, niezależnie od jego pochodzenia gatunkowego. Pogląd Kline'a podziela w zasadzie większość badaczy pracujących nad tym zagadnieniem. Blatt i wsp. (45, 46) badając wysoko oczyszczone preparaty streptokinazy (ciężar cząsteczkowy 42 000) i plazminy (ciężar cząsteczkowy 88 000) doszli do wniosku, że związki te reagują w stosunku ekwimolarnym, a powstały kompleks aktywuje zarówno plazminogen ludzki jak i wołowy. Davies i wsp. (76) stwierdzili, że ekwimolarnie ilości ludzkiego plazminogenu i streptokinazy przy pH 7,5 w obecności EACA (zwiększającego rozpuszczalność) zachowują się w ultrawirówce jak substancja jednorodna.

Od dość powszechnie przyjmowanego poglądu, zakładającego powstanie kompleksów SK-plazminogen i SK-plazmina o charakterze aktywatorów odbiega swoją oryginalnością pogląd badaczy izraelskich, Rimmera i wsp. (93, 203). Autorzy ci, badając aktywowanie plazminogenu przez streptokinazę stosowaną w formie nierozpuszczalnego związku z kopolimerem *p*-aminofenyloalaniny i leucyny, obserwowali powstawanie zarówno aktywatora jak i plazminy w zależności od warunków reakcji. Uważają oni, że w cząsteczce plazminogenu i plazminy jest aktywne centrum, odpowiedzialne za aktywację plazminogenu, a różne od

centrum aktywującego proteolizę. Rola streptokinazy w powstawaniu aktywatora polegałaby na odsłonięciu tego centrum aktywatorowego.

Reakcję aktywacji plazminogenu przy współdziale streptokinazy hamują duże stężenia syntetycznego estru TAME. Roberts (203) uważa, że w reakcji pomiędzy TAME i streptokinazą powstaje nierozpuszczalny związek niezdolny do aktywacji plazminogenu.

Podsumowując należy stwierdzić, iż mechanizm aktywacji plazminogenu do plazminy przez streptokinazę jest tylko częściowo wyjaśniony. Istnienie odrębnego proaktywatora w osoczu ludzkim wydaje się wątpliwe, natomiast słusznym wydaje się założenie powstawania kompleksów SK-plazminogen, SK-plazmina o charakterze aktywatorowym, jakkolwiek mechanizm tworzenia się aktywatora nie jest jeszcze jasny.

Inny aktywator plazminogenu, uzyskana z przesączu gronokowców stafylokinaza (233), podobnie jak streptokinaza nie aktywuje bezpośrednio plazminogenu wołowego. W procesie fibrynolitycznym odznacza się ona mniejszymi właściwościami aktywującymi niż urokinaza i streptokinaza. Mechanizm działania stafylokinazy jest prawdopodobnie różny od mechanizmu działania tych dwu aktywatorów.

IV. Inhibitory fibrynolizy

Inhibitory fibrynolizy najogólniej możnaby podzielić na dwie grupy: inhibitory o charakterze antyplazmin, hamujących działanie plazminy aktywnej oraz antyaktywatory, hamujące aktywację plazminogenu do plazminy.

Do grupy antyplazmin, zaliczyć należy przede wszystkim naturalne inhibitory fibrynolizy, które są ważnym czynnikiem w utrzymaniu równowagi fibrynolitycznej krwi w organizmie. Prawdopodobnie w warunkach fizjologicznych zachodzi równowaga dynamiczna pomiędzy czynnikami proteolitycznymi a ich inhibitorami, warunkująca prawidłowe funkcjonowanie układu fibrynolitycznego. Antyplazmina, naturalny inhibitor plazminy występujący w osoczu krwi, jest stosunkowo mało poznany elementem układu fibrynolitycznego. Najprawdopodobniej działanie antyplazminowe osocza warunkuje nie jedna, lecz kilka substancji. Norman i Hill (182, 183) wyodrębnili z osocza ludzkiego dwie antyplazminy charakteryzując je jako α_1 i α_2 -globuliny. α_1 -Globulina, antyplazmina ciepłochwiejna, odznacza się działaniem hamującym narastającym powoli. α_2 -Globulina, antyplazmina stosunkowo ciepłostała, ma natychmiastowe działanie hamujące. Frakcje α_1 i α_2 -globulinowe mają również aktywność antytrypsynową. Schultze i wsp. (215) wyizolowali obie te frakcje antyproteazowe i scharakteryzowali ich własności fizykochemiczne. Stwierdzili oni wyższą aktywność antyplazminową we frakcji α_2 -globulinowej, natomiast frakcja α_1 -globulinowa odznaczała się

wyższą aktywnością antytrypsynową. Gallimore i wsp. (89) porównali aktywności antyfibrynolityczne we krwi człowieka, psa i królika, stwierdzając najwyższą aktywność w surowicy psiej.

Własności antyplazminowe ma również frakcja β -lipoproteidowa osocza (201, 226) i frakcje γ -globulinowe (165), oraz α_2 makroglobulina surowicza tworząca z plazminą kompleksy o obniżonej aktywności enzymatycznej (90a, 109a).

Własności inhibitorów antyproteolitycznych występujących w moczu opisali Astrup i wsp. (27, 29). Jeden z nich, mingina, wykazuje silne własności antytrypsynowe, a w znacznie mniejszym stopniu hamuje aktywność plazminy i chymotrypsyny. Wyodrębniony w czystej postaci okazał się silnie kwaśnym białkiem, zawierającym komponentę cukrową, nieistotną dla jego funkcji.

Oprócz naturalnych inhibitorów plazminy, występujących w osoczu, tkankach i moczu, znane są naturalne polipeptydy wykazujące silne działanie antyproteazowe, jak inhibitory trypsyny sojowy (SBTI) (169) i trzustkowy (ITT), inhibitor trypsyny i kalikreiny ze ślinianki przyusznej, inhibitor proteolizy z orzeszków ziemnych (30). Inhibitor trzustkowy trypsyny otrzymany został w stanie krystalicznym w roku 1936 przez Kunitza i Northropa (138). Jest to polipeptyd o ciężarze cząsteczkowym 6 000, o dokładnie poznanej strukturze, złożony z 58 aminokwasów (61). ITT jest silnym inhibitorem proteaz, inaktywuje trypsynę, chymotrypsynę, plazminę. Dodany w ilości 200 j/ml osocza całkowicie znosi aktywność proteolityczną i fibrynolityczną zawartej w nim zaktywowanej plazminy. ITT jest nietoksyczny i całkowicie usuwany z krwiotęgu. Preparat ITT pod nazwą *Iniprol* stosowany jest w terapii klinicznej.

Inhibitor trypsyny ze ślinianki przyusznej jest substancją niskocząsteczkową o strukturze identycznej z ITT (143), hamuje aktywność proteolityczną trypsyny, chymotrypsyny, plazminy, kalikreiny, pepsyny oraz aktywację plazminogenu na plazminę (176). Podany w ilości 10–20 j/ml osocza hamuje całkowicie jego aktywność fibrynolityczną i proteolityczną. Stosowany jest obecnie również jako środek leczniczy.

Do drugiej grupy inhibitorów fibrynolizy hamujących aktywację plazminogenu do plazminy, zaliczyć należy syntetyczne inhibitory drobnocząsteczkowe jak wspomniane już EACA, AMCHA oraz PAMBA. Wspólną cechą charakterystyczną dla struktury tych trzech związków jest odległość pomiędzy grupą $-NH_2$ a grupą $-COOH$ wynosząca około 7 Å. Antyfibrynolityczne własności EACA odkryli w latach 1948–1952 badacze japońscy (186, 187), którzy stwierdzili, że związek ten w stężeniu $10^{-5}M$ swoiście hamuje proces fibrynolizy i może być stosowany jako lek przeciwkrwotoczny. W dalszych badaniach stwierdzono, że EACA hamuje kompetytywnie aktywację plazminogenu przez streptokinazę, urokinazę oraz niekompetytywnie — przez trypsynę (2, 6, 14, 16, 56, 84), dla której

jest słabym inhibitorem (7). W wyższych stężeniach EACA hamuje kompetytywnie proteolityczną aktywność plazminy w stosunku do fibrynogenu (41, 84), a nie hamuje jej kazeinolitycznych własności (107), ani nie wpływa na jej własności esterazowe (84). Ostatnio Maxwell i wsp. (156a) przedstawiali dane, że EACA może zmieniać strukturę skrzepu i modyfikować działanie plazminy na fibrynę. Do podobnych wniosków dochodzą Łukasiewicz i Niewiarowski (*Thromb. Diath. Haemorrhag.* w druku). Według tych autorów aktywacja plazminogenu wołowego przez UK i SK hamowana jest przez EACA w stężeniu rzędu $5 \cdot 10^{-2} \text{M}$, podczas gdy fibrynoliza skrzepu niestabilizowanego przez plazminę hamowana jest przy stężeniu rzędu 10^{-4}M , skrzepu stabilizowanego zaś już przy stężeniu rzędu 10^{-5}M . Toksyczność tego związku jest bardzo mała (129, 142, 230, 234, 246, 251) i jest on szybko wydalany z ustroju (178, 179). Dzięki swym właściwościom hemostatycznym EACA znalazł zastosowanie w terapii klinicznej jako środek przeciwkrwotoczny (19, 35, 37, 44, 70, 91, 193).

Własności antyfibrynolityczne AMCHA odkryli również Japończycy (190, 192) w roku 1962. Mechanizm antyfibrynolitycznego działania AMCHA jest podobny do działania EACA. Hamuje on kompetytywnie aktywację plazminogenu do plazminy (80), hamuje fibrynolizę i fibrynogenolizę zachodzącą pod wpływem wolnej plazminy, nie wpływa natomiast na protolityczne własności plazminy w stosunku do kazeiny oraz na jej właściwości esterolityczne. Wydała się z ustroju nieco wolniej niż EACA. W dalszych badaniach nad AMCHA (158, 104) stwierdzono, że izomer *trans* jest około 200 razy silniej działającym inhibitorem niż izomer *cis* (158, 190). Mieszanina obu izomerów AMCHA oraz izomer *trans* (nazywany AMCA) znalazły zastosowanie w leczeniu.

Własności antyfibrynolityczne PAMBA odkryli badacze niemieccy (150, 151) w roku 1963. Podobnie jak EACA i AMCHA dzięki swoim właściwościom antyfibrynolitycznym i hemostatycznym znalazł on również zastosowanie jako środek przeciwkrwotoczny w terapii klinicznej.

Do inhibitorów fibrynolizy zaliczyć również należy silny inhibitor enzymów proteolitycznych — duwizopropylofluorofosforan, jak również niektóre metale ciężkie (131). Reakcję aktywacji plazminogenu do plazminy hamują również aldehydy (232).

V. Niektóre fizjologiczne aspekty fibrynolizy

Miejsce powstawania dwu podstawowych składników układu fibrynolitycznego — plazminogenu i antyplazmin nie jest dobrze poznane. Według Barnhart i Riddle (49) plazminogen jest syntetyzowany i transportowany przez eozynofile. Jak wynika z badań Prokopowicza (198) eozynofile zawierają plazminogen, jednak w nie większym

stopniu niż inne postacie leukocytów. Zdaniem tego autora najwyższą aktywność fibrynolityczną wykazują metamielocyty i pałeczki, w przeciwieństwie do innych proteaz plazminogen nie jest umiejscowiony w ziarnistościach specyficznych leukocytów, lecz znajduje się we wszystkich podfrakcjach komórki. Plazminogen granulocytarny jest prawdopodobnie identyczny z osoczkowym, jak wskazuje porównanie preparatów wysoko oczyszczonych. Być może, granulocyty są miejscem powstawania plazminogenu. Hermann i Miescher (98) wykazali, że fibrynolityczny enzym leukocytów jest tylko bardzo nieznacznie hamowany przez inhibitor plazminy α_2 -globulinę. Natomiast surowiczy inhibitor trypsyny α_1 -globulina w silnym stopniu hamuje proteazę leukocytarną.

Kowalski i wsp. (133) przeprowadzili badania nad występowaniem plazminogenu w różnych tkankach zwierzęcych i stwierdzili największe stężenie tego proenzymu w narządach bogatych w tkankę łączną. Nie jest jednak wyjaśnione, czy komórki tkanki łącznej produkują plazminogen.

Matti i wsp. (156) sugerują, że antyplazmina osocza powstaje w wątrobie. Należy zaznaczyć, że inhibitory fibrynolizy znajdują się również w komórkach krwi, np. krwinkach płytkowych (113) i w erytrocytach (130) oraz w tkankach płuc, śledziony, wątroby (24, 133).

Aktywatory plazminogenu znajdują się w różnych narządach i tkankach (25). Jak wynika z badań Albrechtsena nad tkankami ludzkimi (9) największym stężeniem aktywatora plazminogenu odznacza się macica, w dalszej kolejności nadnercze, gruczoły limfatyczne, tarczyca, płuca, jajniki, przysadka mózgowa, nerka i mięśnie. Natomiast prawidłowa wątroba nie zawiera w ogóle aktywatorów plazminogenu.

Prace szeregu autorów (31, 189) wskazują, że w tkankach mogą znajdować się dwa różne typy aktywatora plazminogenu a) aktywator luźno związany z komórką, wymywalny słabymi roztworami chlorku sodu i potasu, b) aktywator trwale związany z komórką, wymywalny roztworem potasu. Ali i Lack (141) wykazali, że aktywator plazminogenu znajduje się we frakcji lizosomalnej komórek nerkowych.

Aktywator plazminogenu obecny jest w osoczu krwi w warunkach prawidłowych — jego poziom może wzrastać w wielu stanach fizjologicznych np. pod wpływem naporu dnia (114), po wysiłku fizycznym (42), w stanach pobudzenia emocjonalnego (146), a także w stanach zastoju żylnego (64) i niedotlenienia (140), jak i w czasie nadmiernej podaży tlenu (65). Obecność tlenu warunkuje również powstawanie aktywatora plazminogenu w nerce (53). Nasuwa się pytanie, z jakich komórek i tkanek pochodzi aktywator plazminogenu krążący we krwi i jaki jest mechanizm jego przenikania do krwiobiegu.

W piśmiennictwie spotyka się kilka poglądów na ten temat. Mole (164) uważał, że śródbłonek naczyń krwionośnych jest źródłem wzmożonej aktywności fibrynolitycznej u osób zmarłych nagłą śmiercią. Fibry-

nolityczne działanie śródbłonka naczyń krwionośnych stwierdzili w latach późniejszych różni autorzy (160). Na podstawie badań histochemicznych Todd (236) i Warren (245) sądzą, że śródbłonek naczyń krwionośnych jest jednym z podstawowych źródeł osoczonego aktywatora plazminogenu i że aktywator ten jest wydzielany bezustannie do krwiobiegu przez śródbłonki. Liczne leki działające na naczynia powodują przyspieszenie tego procesu (102, 139). Według Lo i Mc Fadzeana (149) istotnym czynnikiem powodującym uwalnianie aktywatora plazminogenu jest podrażnienie efektorów cholinoergicznych, H o l e m a n s i L a n g d e l (100) wysunęli przypuszczenie, że mediatorem fibrynolitycznego działania różnych leków wazoaktywnych może być histamina. Jednak późniejsze doświadczenia H o l e m a n s a (103) nie potwierdziły tego poglądu. Mimo, że benadryl i fenegan hamują hipotensyjne i fibrynolityczne działanie histaminy, to nie wpływają one na spadek ciśnienia krwi i fibrynolizę powstającą po podaniu izopropylonorepinefryny, innego leku antyhistaminowego.

Inny pogląd reprezentują E n d e i A u d i t o r e (32, 83). Według tych autorów komórki tuczne mogą wydzielać do krwiobiegu enzymy proteolityczne i inne substancje aktywujące fibrynolizę. Jednakże, jak wynika z badań C r o n b e r g a i N i l s o n (71) różne substancje indukujące fibrynolizę w organizmie nie powodują istotnych zmian w komórkach tucznych.

W roku 1962 B u l u k i F u r m a n (52) stwierdzili wysoką aktywność fibrynolityczną w krwi żyłnej nerkowej królika i człowieka. W innych pracowniach potwierdzono te spostrzeżenia (50, 177). W o r o w s k i i w s p. (248) badając krew żylną wypływającą z różnych narządów u psa stwierdzili, że jedynie przepływ krwi przez nerkę powoduje aktywację fibrynolizy. P r o k o p o w i c z i w s p. (196) na podstawie badań histochemicznych dochodzą do wniosku, że miejscem powstawania aktywatora plazminogenu w nerce są komórki aparatu przykłębkowego. W czasie doświadczalnego zatrucia chlorkiem rtęci u psa dochodzi do zaniku aktywatora plazminogenu w tkance nerkowej (196), do zahamowania aktywności fibrynolitycznej osocza oraz do wzrostu poziomu plazminogenu i fibrynogenu (249). Podobne zmiany w osoczu krwi można zaobserwować po wyeliminowaniu nerki z krwiobiegu (110, 250). Te fakty przemawiają za tym, że nerka może odgrywać istotną rolę w regulacji fibrynolizy w organizmie.

Zagadnienie, czy urokinaza wydzielana do moczu i aktywator plazminogenu wydzielany przez nerkę do krążenia nerkowego są jedną i tą samą substancją, nie jest rozstrzygnięte. W chorobach nerek dochodzi zarówno do obniżenia aktywności urokinazy w moczu (48), jak i do zmniejszenia się aktywności fibrynolitycznej osocza krwi (72, 185). Badania H o l e m a n s a i w s p. (104) wskazują jednak, że wydzielanie urokinazy nie zawsze zwiększa się w następstwie wewnątrznaczyniowej

aktywacji fibrynolizy pod wpływem niektórych leków. Na podstawie badań immunologicznych K u c i ń s k i i F l e t c h e r (137) dochodzą do wniosku, że urokinaza i aktywator plazminogenu osocza ludzkiego są różnymi substancjami.

Aktywacja czynnika Hagemana (czynnika XII) *in vitro* pod wpływem aktywnych powierzchni zapoczątkowuje łańcuchowy proces krzepnięcia krwi i przyczynia się do aktywacji fibrynolizy (105, 174). Nie jest wykluczone, że podobny proces może mieć miejsce *in vivo*. I a t r i d i s i w s p. (106) oraz H o l e m a n s i R o b e r t s (101) udowodnili ostatnio, że czynnik XII ma duże znaczenie zarówno w aktywacji krzepnięcia jak i w aktywacji fibrynolizy w czasie zastoju żylnego.

Nie ulega wątpliwości, że enzymy fibrynolityczne odgrywają istotną rolę w procesach hemostazy oraz we wchłanianiu złożeń włóknika w ustroju i w gojeniu się ran. Plazmina trawi nie tylko fibrynogen i fibrynę lecz także i inne czynniki krzepnięcia, przede wszystkim czynnik V i VIII (8, 171). W czasie proteolitycznego trawienia fibrynogenu przez plazminę powstają produkty hamujące proces krzepnięcia krwi — antytrombina VI (172, 237), inhibitor powstawania tromboplastyny (173), inhibitor polimeryzacji monomeru fibryny (51). Ostatnio wykazano również, że produkty proteolitycznego trawienia fibrynogenu hamują procesy agregacji i adhezji krwinek płytkowych *in vivo* i *in vitro* (111, 135, 136). Nadmierna aktywacja fibrynolizy stanowi więc duże niebezpieczeństwo dla ustroju doprowadzając do ciężkiej skazy krwotocznej.

Przed kilkadziesiąt laty R o s e n m a n n (212) stwierdził, że enzym fibrynolityczny osocza „trombolizyna”, ulega adsorpcji na skrzepie włóknikowym. W ostatnich latach S h e r r y i w s p. (221) udowodnili, że aktywator plazminogenu działa o wiele lepiej trombolitycznie niż fibrynogenolitycznie. Aktywator ten przenika do skrzepu, gdzie aktywuje plazminogen do plazminy, co doprowadza do strawienia fibryny. Zarówno obecność antyplazminy we krwi jak i szybkie usuwanie nadmiaru krążącego aktywatora przez wątrobę (87) zapobiega powstawaniu plazminy w krwiobiegu, trawieniu krążącego fibrynogenu oraz rozwojowi skazy krwotocznej.

Zagadnienie, czy enzymy fibrynolityczne osocza biorą udział w katabolizmie fibrynogenu i innych czynników krzepnięcia w ustroju nie jest ostatecznie rozstrzygnięte. Uzyskano tu szereg sprzecznych wyników. Podanie dużych dawek EACA, inhibitora fibrynolizy, nie powoduje u zdrowych zwierząt przedłużenia czasu półtrwania fibrynogenu (88, 146). Ten sam związek powoduje jednak zahamowanie rozpadu fibrynogenu u osób ze wzmożoną fibrynolizą (18). N i e w i a r o w s k i i W o ł o s o w i c z (178) stwierdzili, że EACA podany jednorazowo zdrowym osobom powoduje nieznaczny wzrost poziomu fibrynogenu oraz zahamowanie zużycia plazminogenu i antyplazminy. U psów zatrutych chlorkiem rtęci, mimo znacznego wzrostu poziomu fibrynogenu i zaha-

mowania aktywności fibrynolitycznej osocza półokres biologicznego trwania fibrynogenu ulega nawet skróceniu (90).

Copley (69), Astrup (26), Jensen (112), postulowali, że w krwi krążącej procesy krzepnięcia i fibrynolizy zachodzą w sposób ciągły i ustawiczny. Cieniutkie błony fibryny odkładają się, zgodnie z tą teorią, na wewnętrznej powierzchni naczyń krwionośnych i są trawione przez aktywowaną plazminę. Nowsza teoria hemostazy sformułowana przez Spaeta (229) zakłada, że mechanizmy krzepnięcia są uruchamiane jedynie w miejscu przerwania ciągłości ściany naczynia. Nadmiar aktywnych czynników krzepnięcia ma być zobojętniany przez inhibitory i klawrowany przez układ ściankowo-śródbłonkowy i wątrobę. Rola enzymów fibrynolitycznych polegałaby — w myśl tej teorii — przede wszystkim na miejscowym usuwaniu złożeń włókienka i zapobieganiu nadmiernemu rozszerzaniu się skrzepu w miejscu uszkodzenia naczynia.

Nie jest wykluczone, że enzymy fibrynolityczne osocza wpływają i na inne fizjologiczne procesy, na przykład na regulację krążenia krwi. Podanie dużych dawek plazminy lub aktywatora plazminogenu prowadzi do spadku ciśnienia krwi i zużycia prekursorów kinin (kininogenu) (214). Według Vogta (241) plazmina aktywuje kalikreinogen na kalikreinę, a kalikreina uwalnia bradykininę z nieczynnych prekursorów. Bradykinina obniża ciśnienie krwi i zwiększa szybkość przepływu krwi przez nerkę. Prawdopodobnie rola nerki w regulacji ciśnienia krwi polega nie tylko na wydzielaniu reniny aktywującej angiotenzynogen i warunkującej powstawanie podnoszącej ciśnienie krwi angiotenzyny II. Buluk i Małofiejew (54) stwierdzają, że aktywator plazminogenu w krążeniu nerkowym zapoczątkowuje szereg reakcji prowadzących do powstawania kinin obniżających ciśnienie krwi. Ostatnio Prokopowicz i wsp. (197, 199) stwierdzili zahamowanie fibrynolizy w doświadczalnym i klinicznym nadciśnieniu tętniczym.

LITERATURA

1. Abe T., Astrup T., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **4**, 201 (1960).
2. Abe T., Sato A., *Proc. 7th Congr. Europ. Soc. Haemat.*, Londyn 1959, cz. II, 119, 1960.
3. Ablondi F. B., Hagan J. J., *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* **95**, 195 (1957).
4. Ablondi F. B., De Renzo E. C., *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* **102**, 717 (1959).
5. Ablondi F. B., Hagan J. J., Philips M., De Renzo C., *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 153 (1959).
6. Ablondi F. B., De Renzo E. C., *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* **102**, 717 (1959).
7. Ablondi F. B., Hagan J. J., Philips M., De Renzo E. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 153 (1959).
8. Alagille D., Soulier J. P., *La Semaine des Hopitaux de Paris* **32**, 355 (1956).
9. Albrechtsen O. K., *Brit. J. Haemat.* **3**, 284 (1957).

10. Ali S. Y., Lack C. H., *Biochem. J.* **96**, 63 (1965).
11. Alkjaersig N., Fletcher A. P., Sherry S., *J. Biol. Chem.* **233**, 81 (1958).
13. Alkjaersig N., Fletcher A. P., Sherry S., *J. Biol. Chem.* **233**, 86 (1958).
14. Alkjaersig N., Fletcher P., Sherry S., *J. Biol. Chem.* **234**, 832 (1959).
15. Alkjaersig N., Fletcher P., Sherry S., *J. Clin. Invest.* **38**, 1086 (1959).
16. Alkjaersig N., Fletcher A. P., Sherry S., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **3**, 360 (1959).
17. Alkjaersig N., *Biochem. J.* **93**, 171 (1964).
18. Amris A., Amris C. J., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **11**, 404 (1964).
19. Andersson L., *Acta Chir. Scand.* (suppl.) **301**, 1062.
20. Astrup T. P., Permin M., *Nature* **159**, 681 (1947).
21. Astrup T., Müllertz S., *Arch. Biochem.* **40**, 346 (1952).
22. Astrup T., Sterndorff, *Proc. Soc. Expl. Biol.* **81**, 675 (1952).
23. Astrup T., Stage A., *Nature* **190**, 929 (1952).
24. Astrup T., Stage A., *Acta Chem. Scand.* **10**, 617 (1956).
25. Astrup T., *Blood* **11**, 781 (1956).
26. Astrup T., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **2**, 347 (1958).
27. Astrup T., Alkjer K., Soardi F., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **11**, 181 (1959).
28. Astrup T., *Blood* **11**, 181 (1959).
29. Astrup T., Nissen U., *Nature* **203**, 253 (1964).
30. Astrup T., Brokman P., Ollendorf P., Rassmussen J., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **5**, 329 (1960).
31. Astrup T., *Fed. Proc.* **25**, 42 (1966).
32. Auditore J. V., Ende N., Katayama Y., *Life Science* **6**, 375 (1963).
33. Bachmann F. W., Fletcher A. P., Sherry S., *Fed. Proc.* **22**, 562 (1962).
34. Bachmann F. W., Fletcher A. P., Alkjaersig N., Sherry S., *Biochemistry* **3**, 1578 (1964).
35. Bar-Pratkowska J., Niewiarowska M., Dobraczyńska J., *Ginekologia Polska* **35**, 81 (1964).
36. Banhart M. J., Riddle J. M., *Blood* **21**, 306 (1963).
37. Bergson K., Blomback B., Kleen G., *Acta Med. Scand.* **168**, 291 (1961).
38. Bergström K., *Ark. Kemi.* **21**, 517 (1963).
39. Bergström K., *Ark. Kemi.* **21**, 547 (1963).
40. Bergström K., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 673 (1963).
41. Bickford A. F., Taylor F. B., *Fed. Proc.* **21**, 63 (1962).
42. Biggs R., Macfarlane R. G., Pilling J., *Lancet* **1**, 407 (1947).
43. Billimoria J. D., Drysdale J., James D. C. O., Mac Langan N. F., *Lancet* **2**, 471 (1951).
44. Birkmayer W., Wieler G., *Wien Klin. Wschr.* **74**, 454 (1962).
45. Blatt W. F., Segal H., Gray J. L., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **11**, 393 (1964).
46. Blatt W. F., Gray J. L., Jensen H., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **11**, 85 (1964).
47. Bogomołowa A. G., Kortawowa A., *West Chir.* **110** (1935).
48. Boomgaard J., „Urokinase” — Thesis — Amsterdam 1965, Drukkerij Aemstelstad.
49. Boomgaard J., Deggeller K., *Clin. Chim. Acta* **13**, 498 (1966).
50. Brakman P., Astrup T., *Fed. Proc.* **24**, 387 (1965).
51. Budzyński A. Z., Latałło Z., Lipiński B., Kowalski E., *Bull. Acad. Polon. Sci.* **11**, 477 (1963).
52. Buluk K., Furman M., *Experientia* **18**, 146 (1962).
53. Buluk K., Małofiejew M., *Acta Physiol. Polon.* **14**, 371 (1963).

54. Buluik K., Małofiejew M., *Acta Med. Polon.* 6, 405 (1965).
55. Burges R. A., Brammer K. W., Coombes J. D., *Nature* 208, 894 (1965).
56. Celander D. R., Dell Naschke H., Guest H. N., *Texas Rep. Biol. Med.* 19, 50 (1961).
57. Chan J. Y., Mertz E. F., *Can. J. Biochem.* 44, 469 (1966).
58. Chan J. Y. S., Mertz E. T., *Can. J. Biochem.* 44, 475 (1966).
59. Chan J. Y. S., Mertz E. T., *Can. J. Biochem.* 44, 487 (1966).
60. Chang P. K., McCoy W. R., Pinkus G., *J. Biol. Chem.* 240, 93 (1965).
61. Chauvet J., Nouvel G., Acher R., *Biochim. Biophys. Acta* 92, 200 (1964).
62. Christensen L. R., MacLeod C. M., *J. Gen. Physiol.* 28, 559 (1945).
63. Christensen L. R., Smith D. H., Jr., *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* 74, 840 (1950).
64. Clarke R. L., Orandi A., Clifton E. E., *Angiology* 11, 367 (1960).
65. Clifton E. E., Clarke R. L., *Angiology* 14, 285 (1963).
66. Clifton E. E., Cannamela D., *J. Appl. Physiol.* 6, 42 (1953).
67. Cohly M. A., Shulman S., *Biochim. Biophys. Acta* 73, 293 (1963).
68. Cole E. R., Mertz E. T., *Can. J. Biochem. Physiol.* 39, 1419 (1961).
69. Copley A. L., I Intern. Conf. on Thromb. and Embolism, Benno Schwabe, Basel 452, 1954.
70. Colton A., Schwarzenberg H., Amiel J. B., Hothe G., *Presse Med.* 71, 2037 (1963).
71. Cronberg S., Nilsson J. M., *Acta Path. Microbiol. Scand.* 60, 156 (1964).
72. Czarniecki W. — doniesienie osobiste.
73. Dalby A., Cole E. R., Mertz E. T., *Can. J. Biochem. Physiol.* 38, 1029 (1960).
74. Dastre A., *Arch. Physiol. Norm. Path.* 5, 661 (1893).
75. Davies M. C., Englert M. E., *J. Biol. Chem.* 235, 1011 (1960).
76. Davies M. C., Englert M. E., De Renzo E. C., *J. Biol. Chem.* 239, 2651 (1964).
77. Delezenne C., Pozerski E., *Compt. Rend. Soc. Biol.* 55, 327 (1903).
78. Derechin M., *Biochem. J.* 78, 443 (1961).
79. Derechin M., Johnson P., Szuchet S., *Biochem. J.* 84, 336 (1962).
80. Dubber A. H. C., McNicol G. P., Douglas A. S., *Brit. J. Haematol.* 11, 237 (1965).
81. Edsall J. T., Ferry R. M., Armstrong S. H., Jr., *J. Clin. Invest.* 23, 557 (1944).
82. Engel A., Alexander B., Pechet L., *Biochemistry* 5, 1543 (1966).
83. Ende N., Auditore J. V., *Nature* 189, 593 (1961).
84. Fakutake K., Shida K., Arakawa T., Koto K., *Blood* 15, 689 (1960).
85. Fantl P., *Science* 135, 787 (1962).
86. Fearnley G. R., Balmforth G. V., Fearnley E., *Clin. Sci.* 16, 645 (1957).
87. Fletcher A. P., Biedermann O., Moore D., Alkjaersig N., Sherry S., *J. Clin. Invest.* 43, 681 (1964).
88. Gajewski J., Alexander B., *Circulation Res.* 13, 432 (1963).
89. Gallimore M. J., Nulkar M. V., Shaw I. T. B., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 14, 145 (1965).
90. Gałasiński W., Worowski K., Niewiarowski S., Franecki G., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 18, 268 (1967).
- 90a. Ganrot P. O., *Clin. Chim. Acta* 16, 328 (1967).
91. Gans H., Lüllchei C. W., Krivit W., *Ann. Surg.* 154, 915 (1961).
92. Garner R. L., Tillett W. S., *J. Expl. Med.* 60, 255 (1934).
93. Gutman M., Rimon A., *Can. J. Biochem.* 42, 1339 (1964).

94. Hagan J. J., Ablondi F. B., De Renzo E. C., *J. Biol. Chem.* **235**, 1005 (1960).
95. Hagan J. J., *Proceedings of the Conference on Thrombolytic Agents*, Chicago, U.S., H. R. Roberts, J. D. Gieratz (wyd.) Public. Health Service, 1960, str. 39.
96. Hedin S. G., *J. Physiol.* **30**, 195 (1903).
97. Hedner M., Nillsson I. M., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **14**, 545 (1965).
98. Herman G., Miescher P. A., *Int. Arch. Allergy* **27**, 346 (1965).
99. Holemans R., Gross R., *Acta Haematol.* **26**, 110 (1961).
100. Holemans R., Langdell R. D., *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* **115**, 584 (1964).
101. Holemans R., Roberts H. R., *J. Lab. Clin. Med.* **64**, 778 (1964).
102. Holemans R., *Amer. J. Physiol.* **208**, 511 (1965).
103. Holemans R., *Fed. Proc.* **25**, 100 (1966).
104. Holemans R., McConnell D., Johnston J. G., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **15**, 192 (1966).
105. Iatridis S. G., Ferguson J. H., *J. Clin. Invest.* **41**, 1277 (1962).
106. Iatridis S. G., Iatridis P. G., Ferguson J. H., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **16**, 207 (1966).
107. Iagara T., Watanabe H., Amano M., Dakamoto S., *Keio J. Med.* **8**, 225 (1959).
108. Jackson H., Mertz D., *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* **86**, 827 (1954).
109. Jacobsen C. D., *Scand. J. Lab. Invest.* **16**, 372 (1964).
- 109a. James K., Taylor F. B., Fudenberg H. H. Jr., *Biochim. Biophys. Acta* **133**, 374 (1967).
110. Januszek T., Furman M., Buluk K., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **15**, 554 (1966).
111. Jerushalmy Z., Zucker M., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **15**, 413 (1966).
112. Jensen H., *Expl. Med. Surg.* **14**, 189 (1956).
113. Johnson A. S., Schneider C. L., *Science* **117**, 229 (1953).
114. Kaniak J., Siwińska M., Krakowska-Rechnicowa J., Iwaszkiewicz S., Kornaszewska W., *Post. Hig. Med. Dośw.* **11**, 355 (1957).
115. Kaplan M. H., *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* **57**, 40 (1944).
116. von Kaulla K. N., *J. Lab. Clin. Med.* **44**, 944 (1954).
117. von Kaulla K. N., Weiner M., *Blood* **10**, 362 (1955).
118. von Kaulla K. N., Schultz, *Am. J. Clin. Path.* **29**, 104 (1958).
119. von Kaulla K. N., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **10**, 151 (1963).
120. von Kaulla K. N., *Fed. Proc.* **25**, 57 (1966).
121. Kjeldgaard N. O., Ploug J., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 289 (1957).
122. Kleniewski J., *Acta Med. Polon.* **6**, 257 (1965).
123. Kline D. L., *J. Biol. Chem.* **204**, 949 (1953).
124. Kline D. L., Fishman J. B., *J. Biol. Chem.* **236**, 2807 (1961).
125. Kline D. L., Fishman J. B., *J. Biol. Chem.* **236**, 3232 (1961).
126. Kline D. L., *Proc. 9th Congr. Europ. Soc. Haemat.*, Lisbon, 1312, 1963.
127. Kline D. L., Fishman J. B., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **11**, 75 (1964).
128. Kopeć M., *Post. Hig. Med. Dośw.* **12**, 295 (1958).
129. Kostro B., Prokopowicz J., Serwatko A., *Acta Physiol. Polon.* **15**, 439 (1964).
130. Kotschy M., Jacobsen C. D., *Scand. J. Clin. Labor. Invest.* **16**, 55 (1964).
131. Kowalski E., Latałło Z., Niewiarowski S., *Sang* **5**, 446 (1956).
132. Kowalski E., Latałło Z., Niewiarowski S., *Acta Biochim. Polon.* **3**, 87 (1956).

133. Kowalski E., Kopeć M., Latałło Z., Roszkowski S., Sendys N., *Blood* **8**, 436 (1958).
134. Kowalski E., Kopeć M., Niewiarowski S., *J. Clin. Path.* **12**, 215 (1959).
135. Kowalski E., Budzyński A. Z., Kopeć M., Latałło Z. S., Lipiński B., Węgrzynowicz Z., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **12**, 69 (1964).
136. Kowalski E., Kopeć M., Węgrzynowicz Z., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **10**, 406 (1964).
137. Kuciński Ch., Fletcher A., *Fed. Proc.* **25**, 194 (1966).
138. Kunitz M., Northrop J. M., *J. Gen. Physiol.* **19**, 991 (1936).
139. Kwaan H. C., Lo R., McFadzean A. J. S., *Clin. Sci.* **16**, 255 (1957).
140. Kwaan H. C., McFadzean A. J. S., *Clin. Sci.* **15**, 245 (1956).
141. Lack C. H., Ali S. Y., *Nature* **201**, 1030 (1964).
142. Lang K., Bitz H., *Biochem. Z.* **324**, 495 (1953).
143. Laskowski M., Informacja ustna.
144. Lassen M., *Acta Phys. Scand.* **27**, 371 (1952).
145. Lassen M., *Biochem. J.* **69**, 360 (1958).
146. Latner A. L., *Lancet* **1**, 194 (1957).
147. Lesuk A., Terminiello L., Throven Y. H., *Science* **147**, 880 (1965).
148. Lewis J. H., *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* **114**, 777 (1963).
149. Lo R., McFadzean A. J. S., *Clin. Science* **17**, 499 (1958).
150. Lohmann K., Markwardt F., Landmann H., *Naturewiss.* **14**, 592 (1963).
151. Lohmann K., Markwardt F., Landmann H., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **10**, 424 (1964).
152. Loomis E. C., George C., Ryder A., *Arch. Biochem.* **12**, 1 (1947).
153. Lorand L., Condit E. V., *Biochemistry* **4**, 265 (1965).
154. Marcus G., Ambrus M., *J. Biol. Chem.* **235**, 1673 (1960).
155. Marcus G., Werkheisser W., *J. Biol. Chem.* **239**, 2673 (1964).
156. Matti R., Ambrus J. L., Sokal J. E., Mink J., *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* **116**, 69 (1964).
- 156a. Maxwell R. E., Allen D., *Nature* **209**, 211 (1966).
157. McCall D. C., Kline D. L., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **14**, 116 (1965).
158. Melander B., Gliniecki G., Granstrand B., Hanshoff G., Abstract G 68 Xth Congress of the International Society of Haematology, Sweden Ang. 30 Sept. 4, 1964.
159. Mertz K. T., Chan Y. J. S., *Can. J. Biochem. Physiol.* **41**, 1811 (1963).
160. Messer D. L., Celander D. R., Guest M. M., *Circulation Res.* **11**, 82 (1962).
161. Meyers W. M., Burdon K. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **62**, 6 (1956).
162. Mitchell P., Cope I., *Clin. Chim. Acta* **2**, 414 (1965).
163. Milistow M. W., *J. Immunol.* **42**, 109 (1941).
164. Mole R. H., *J. Path. Bact.* **60**, 413 (1948).
165. Moriau M., de Vries S. T., Dik H. J., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **10**, 355 (1964).
166. Müllertz S., Lassen H., *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* **82**, 264 (1953).
167. Müllertz S., *Biochem. J.* **61**, 424 (1955).
168. Müllertz S., *Acta Physiol. Scand.* (suppl.) **38**, 130 (1956).
169. Nanninga L. B., Guest H. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **108**, 542 (1964).
170. Nanninga L. B., Zeller R., Maynes C., *J. Lab. Clin. Med.* **64**, 706 (1964).
171. Niewiarowski S., Latałło Z., *Bull. Acad. Polon. Sci.* **5**, 219 (1957).
172. Niewiarowski S., Kowalski E., *Rev. Haematol.* **13**, 320 (1958).
173. Niewiarowski S., Latałło Z., Stachurska J., *Rev. Haematol.* **14**, 118 (1959).

174. Niewiarowski S., Prou-Wartelle O., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **3**, 593 (1959).
175. Niewiarowski S., Latallo Z., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **3**, 404 (1959).
176. Niewiarowski S., *Pol. Arch. Med. Wewn.* **34**, 211 (1964).
177. Niewiarowski S., Prokopowicz J., Popławski A., Woronowski K., *Experientia* **20**, 101 (1964).
178. Niewiarowski S., Wołosowicz N., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **15**, 491 (1966).
179. Nilson J. M., Sjoerdsma A., Waldenstrom J., *Lancet* **18**, 1322 (1960).
180. Nissen U., Astrup T., *Fed. Proc.* **25**, 193 (1966).
181. Nolf P., *Arch. Intern. Physiol.* **6**, 306 (1908).
182. Norman P. S., *J. Expl. Med.* **108**, 53 (1958).
183. Norman P. S., Hill B. H., *J. Expl. Med.* **108**, 639 (1958).
184. Norman P. S., *Fed. Proc.* **19**, 62 (1960).
185. Nowak A., Zahorska-Markiewicz B., *Pol. Arch. Med. Wewn.* **35**, 653 (1965).
186. Okamoto S., Nagasawa F., *Feref to British Patent*, No 770, 693 (1957).
187. Okamoto S., *Keio J. Med.* **8**, 211 (1959).
188. Okamoto S., Okamoto U., *Keio J. Med.* **11**, 105 (1962).
189. Okamoto S., Takada Y., *Keio J. Med.* **13**, 107 (1964).
190. Okamoto S., Sato S., Takada Y., Okamoto U., *Keio J. Med.* **13**, 177 (1964).
191. Opher A. W., Miller J. M., *Expl. Med. Surg.* **22**, 246 (1964).
192. Oshiba S., Okamoto U., *Keio J. Med.* **11**, 117 (1962).
193. Oswald W., *Ars. Med.* **51**, 531 (1961).
194. Ploug J., Kjeldgaard N. O., *Arch. Biochem.* **62**, 500 (1956).
195. Ploug J., Kjeldgaard N. O., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 282 (1957).
196. Prokopowicz J., Rejniak L., Niewiarowski S., Worowski K., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **12**, 396 (1964).
197. Prokopowicz J., Worowski K., Popławski A., Gabryelewicz A., Niewiarowski S., *Experientia* **23**, 224 (1967).
198. Prokopowicz J., Praca habilitacyjna, (w przygotowaniu.)
199. Prokopowicz J., Worowski K., Popławski A., Myśliwiec M., Niewiarowski S., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **1**, 17 (1967).
200. Remmert L. F., Cohen P., *J. Biol. Chem.* **181**, 431 (1949).
201. Riding I. M., Ellis D., *J. Artherosclerosis. Res.* **4**, 189 (1964).
202. Rife J. U., Shulman S., *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 328 (1964).
203. Rimon A., Gutman M., Rimon S., *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 301 (1963).
204. Robbins K. C., Summaria L., *J. Biol. Chem.* **238**, 952 (1963).
205. Robbins K. C., Summaria L., Elwyn D., Barlow G. J., *J. Biol. Chem.* **240**, 541 (1965).
- 205a. Robbins K. C., Summaria L., Hsieh B., Shaw R. J., *J. Biol. Chem.* **242**, 2333 (1967).
206. Roberts P. S., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 145 (1963).
207. Roberts P. S., *Can. J. Biochem.* **42**, 1841 (1964).
208. Roberts P. S., *J. Biol. Chem.* **232**, 185 (1958).
209. Roberts J. T., *J. Clin. Path.* **18**, 586 (1965).
210. Rochae Silva M., Rimington C., *Biochem. J.* **43**, 163 (1948).
211. Rosenman M., *Biochem. Z.* **128**, 372 (1922).
212. Rosenman M., *Biochem. Z.* **129**, 101 (1922).
213. Rosenman M., *Biochem. Z.*, **293**, 313 (1937).
214. Salmon J., Lecomte J., *Rev. Franc. d'Et. Clin. Biol.* **8**, 473 (1963).

215. Schultze H. F., Heiburger N., Heide K., Haupt H., Storiko K., Schwisk H. G., *Proc. 9-th Congr. Europ. Soc. Haemat., Lisbon* (S. Karger) 131, 1963.
216. Sgouris J. T., Inman J. K., McCall K. B., Hyndman L. A., Anderson H. D., *Vox Sang.* 5, 357 (1960).
217. Sgouris J. T., Inman J. K., McCall K. B., *Am. J. Cardiol.* 2, 406 (1960).
218. Sgouris J. T., Inman J. K., *Vox Sang.* 6, 53 (1961).
219. Sgouris J. T., Storey R. W., McCall K. B., Anderson H. D., *Vox Sang.* 7, 739 (1963).
220. Sherry S., Alkjaersig N., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 1, 264 (1957).
221. Sherry S., Fletcher A. P., Alkjaersig N., *Physiol. Rev.* 39, 343 (1959).
222. Sherry S., Alkjaersig N., Fletcher A. P., *J. Lab. Clin. Med.* 64, 145 (1964).
223. Shulman S., Alkjaersig N., Sherry S., *J. Biol. Chem.* 233, 91 (1958).
224. Shulman S., Rife U., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 5, 396 (1961).
225. Shulman S., Rife U., *Biochim. Biophys. Acta* 86, 317 (1963).
226. Skrzydlewski Z., Niewiarowski S., Skrzydlewska J., *J. Atheros Res.* 6, 273 (1966).
227. Slota K. H., Gonzales J. D., *Biochemistry* 3, 285 (1964).
228. Sobel G. W., Mohler S. R., Jones N. W., Dowdy A. B. C., Guest M. M., *Am. J. Physiol.* 171, 768 (1952).
229. Spaet T. H., *Blood* 28, 12 (1966).
230. Sparan M. B., Clinical report to Medical research section. Lederle Lab. Pearl. River. New York 1962.
231. Steinbuch M., Niewiarowski S., *Nature* 186, 87 (1960).
232. Staprans I., Fletcher B., Taylor Jr., *Biochim. Biophys. Acta* 110, 148 (1965).
233. Sweet B., McNicol G. P., Douglas A. S., *Clin. Sci.* 29, 375 (1965).
234. Thomas K., Goerne M. H. G., *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 92, 163 (1914).
235. Tillett W. S., Garner R. L., *J. Expl. Med.* 58, 485 (1933).
236. Todd A. S., *British Med. Bull.* 20, 210 (1964).
237. Triantaphyllopoulos D. C., *J. Am. Physiol.* 197, 575 (1959).
238. Troll W., Sherry S., Wachman J., *J. Biol. Chem.* 209, 85 (1954).
239. Ts'ao C. H., Kline D. L., *Fed. Proc.* 25, 194 (1966).
240. Ungar G., Damgaard E., Hummel F. P., *Endocrinology* 49, 805 (1951).
241. Vogt W. J., *J. Physiol. (London)* 160, 153 (1964).
242. Wallen P., Bergström K., *Acta Chem. Scand.* 13, 1464 (1959).
243. Wallen P., *Ark. Kemi.* 19, 469 (1962).
244. Wallen P., *Ark. Kemi.* 19, 451 (1962).
245. Warren B. A., *Brit. Med. Bull.* 20, 213 (1964).
246. Watanabe N., Tahita J., Shirasahi K., *Folia Pharmacol. Japan* 45, 93 (1949).
247. Williams J. R. B., *Brit. J. Expl. Path.* 32, 530 (1951).
248. Worowski K., Niewiarowski S., Prokopowicz J., *Bull. Acad. Polon. Sci.* 12, 433 (1964).
249. Worowski K., Niewiarowski S., Prokopowicz J., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 12, 87 (1964).
250. Worowski K., Popławski A., Kochańska J., Niewiarowski S., *Bull. Acad. Polon. Sci.* 13, 683 (1965).
251. Yude N., Hollesy D. W., Clinical Report to Medical Research Section Lederle Lab. Pearl. River, New York 1961.
252. Yudin S. S., *Lancet* 2, 361 (1937).
253. Zylber J., Blatt W. F., Jensen H., *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* 102, 755 (1959).

Polskie Towarzystwo Biochemiczne na Walnym Zebraniu w dniu
29 września 1967 roku nadało:

prof. dr JÓZEFOWI HELLEROWI

i

prof. dr WŁODZIMIERZOWI NIEMIERCE

Członkostwo Honorowe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

JANINA KWIATKOWSKA *

Budowa hemoglobiny i jej związek z funkcją

The Structure of Haemoglobin and its Correlation with Function

The recent data on the primary and three-dimensional structure of various haemoglobins are reviewed. The correlation between the conformational changes of the molecule and the interaction with ligands is discussed.

W ciągu ostatnich lat została poznana pierwotna i wtórna budowa hemoglobiny. Badanie zmian strukturalnych, zachodzących przy połączeniu globiny z hemem, oraz przy reakcjach hemoglobiny z ligandami, poznawanie równowagi i kinetyki tych reakcji, a także mechanizmu takich zjawisk jak efekt Bohra czy oddziaływanie hem — hem stwarza możliwości wyjaśnienia zależności funkcji hemoglobiny od jej struktury.

I. Budowa hemoglobiny

W skład krwi ludzkiej i zwierzęcej wchodzi zazwyczaj więcej niż jeden rodzaj hemoglobiny. Schroeder wyróżnia trzy rodzaje heterogeniczności hemoglobiny: dojrzewania, składników dodatkowych i genetyczną (107). Do pierwszej zalicza się występowanie hemoglobiny płodowej F obok A w krwi pępowinowej, do drugiej pojawienie się niewielkiej ilości składników dodatkowych obok głównego — A₂, A₃, A₄ obok A, F₁ obok F. Oba te rodzaje heterogeniczności uważa się za zjawisko prawidłowe. Natomiast występowanie innych, uwarunkowanych genetycznie form, towarzyszących hemoglobinie A u osobników heterozygotycznych związane jest zazwyczaj z zaburzeniami funkcjonalnymi i objawami chorobowymi lub skłonnością do nich. Hemoglobiny takie określa się jako nieprawidłowe.

Różnorodne hemoglobiny rozdzielić można stosując chromatografię na żywicach i wymiennicach jonowych (31, 55, 80, 106), oraz elektroforezę bibułową, na żelu skrobiowym i agarze (14, 35, 95).

* Dr, adiunkt Zakładu Chemii Fizjologicznej Wrocławskiej Akademii Medycznej

Masa cząsteczkowa wszystkich hemoglobin ssaków, oznaczana w rozcieżnionych roztworach, w obojętnym pH i umiarkowanej sile jonowej wynosi około 66 000. Jednakowa jest też ogólna budowa cząsteczki — wszystkie te hemoglobiny składają się z czterech łańcuchów polipeptydowych, przy czym każdy z nich połączony jest z hemem. Z wyjątkiem kilku hemoglobin nieprawidłowych łańcuchy te są zwykle parami identyczne (84). W ludzkich i zwierzęcych hemoglobinach A łańcuchy te określa się α i β , w A_2 zamiast łańcucha β występuje δ , a w płodowej — γ .

1. Budowa pierwszorzędowa hemoglobin

Hemoglobiny ludzkie prawidłowe. W ostatnich latach poznano strukturę hemoglobin A, A_2 , A_3 , F i F_1 dzięki wprowadzeniu metod wyodrębniania poszczególnych łańcuchów, oraz nowych metod analitycznych na przykład „fingerprint” produktów trawienia hemoglobin enzymami proteolitycznymi. Łańcuchy α , β i γ rozdziela się metodą Ingrama na *Amberlicie* IRC-50 (56, 59), metodą Huehnsa na *CM*-celulozie jako cyjanopochodne (54), oraz według Bucci i Fronticelli jako związane z PCMB i przeprowadzane następnie w wolne, aktywne SH-łańcuchy (28, 114).

Hemoglobina A ($\alpha_2^A \beta_2^A$) stanowi 95% hemolizatu krwi ludzkiej. Łańcuch α zawiera 141, β — 146 reszt aminokwasowych. Ich sekwencja aminokwasowa jest ustalona (24, 46, 72, 110).

Hemoglobina A_2 składa się z dwu łańcuchów α identycznych z α^A oraz z dwu łańcuchów szybko wędrujących w elektroforezie, odmiennych od β i nazwanych δ (61). Nie są one zmutowanymi łańcuchami β i syntezą ich kieruje odrębny gen (60). Łańcuch δ różni się od β usytuowaniem siedmiu aminokwasów (16).

Mapa peptydów po trawieniu trypsyną hemoglobiny A_3 jest identyczna z hemoglobina A, z wyjątkiem jednego dodatkowego peptydu: Glu-Gli-Cys. Uważa się, że hemoglobina A_3 jest połączeniem hemoglobiny A z glutationem. Rodzaj wiązania i jego miejsce nie jest ustalone (82).

W krwi ludzkiej i króliczej znaleziono w trakcie rozdzielania na *Amberlicie* IRC-50 jeszcze jeden składnik dodatkowy — hemoglobinę A_4 . Różnice w budowie A_4 i A nie zostały dotychczas poznane (75).

Hemoglobina płodowa F ma łańcuchy α identyczne z hemoglobina A (56, 65, 109, 111). Łańcuchy γ zawierają, podobnie jak β , 146 aminokwasów, ale różnią się od nich sekwencją 39 reszt aminokwasowych (107).

Hemoglobina F_1 , która towarzyszy jako mała frakcja hemoglobinie F w krwi pępowinowej, o acetylenowym łańcuchu γ ma budowę $\alpha_1^A \gamma_2^F \gamma^{\text{acetylo}F}$. Jest to pierwszy wykryty przypadek występowania nieidentycznych łańcuchów w parze (108).

Hemoglobiny ludzkie nieprawidłowe. Jedną z anomalii budowy hemoglobiny jest brak różnorodnych łańcuchów. Cząsteczka jest wówczas te-

tramerem identycznych podjednostek. Zgodnie z poglądami H u n t a i L e h m a n n a (57) syntezę łańcuchów α i β kontrolują oddzielne układy regulujące i zaburzenie jednego z tych układów wywołuje zmniejszenie lub zahamowanie syntezy jednego tylko rodzaju łańcucha. Zaburzenia tego rodzaju występują w talasemiach, określanych odpowiednio jako α i β talasemia (57). Przykładem hemoglobin zbudowanych z jednego rodzaju łańcucha jest hemoglobina H o strukturze β_4^A (64), hemoglobina Bart — γ_4^F (68) i odkryta przez D a n c e i H u e h n s a hemoglobina o budowie δ_4^A (33).

W innym rodzaju hemoglobin patologicznych jedna para łańcuchów jest niezmieniona, w drugiej zaś występuje defekt. Rozpowszechnienie metody „*fingerprint*” I n g r a m a (58) i techniki hybrydyzacji I t a n o i S i n g e r a (62) pozwoliło wyodrębnić i zbadać szereg hemoglobin patologicznych. Okazało się, że wiele z nich, wyodrębnionych z krwi różnych osobników i traktowanych jako odrębne przypadki ma ten sam defekt budowy. Badanie funkcji wyodrębnionych hemoglobin nieprawidłowych, ich reakcji z ligandami i zjawisk z tym związanych pozwala wysnuwać wnioski o znaczeniu pewnych aminokwasów dla wtórnej budowy hemoglobiny i dla jej funkcji. Badania takie przeprowadzono między innymi na hemoglobinie M_{Ivate} , $M_{Chicago}$, $M_{Kankakee}$ (43, 51).

W tablicy 1 przedstawiono zmiany w budowie niektórych hemoglobin patologicznych, polegające na podstawieniu jednego tylko aminokwasu w łańcusu α lub β . Zmiany zachodzą zawsze w obu łańcuchach danej pary.

W hemoglobinie Koelliker określanej jako $\alpha_2^{mn148} \text{Agr } 141 \beta_2^A$ defekt polega na braku końcowej argininy w łańcuchu α (79). Znane są też hemoglobiny, w których aminokwasy zmienione są w dwu miejscach. W hemoglobinie C_{Harlem} następuje to w obrębie jednego łańcucha. W pozycji 6 łańcucha β kwas glutaminowy zastąpiony jest przez walinę, a w pozycji 73 — kwas asparaginowy przez asparaginę (22). Obserwowano także zmiany w obrębie obu par łańcuchów: w hemoglobinie *Memphis/S* i *Memphis/C* zmianie w pozycji 23 łańcucha α , typowej dla hemoglobiny *Memphis* ($\text{Glu} \rightarrow \text{Glu}-\text{NH}_2$), towarzyszy podstawienie glutaminy w pozycji 6 łańcucha β przez walinę w pierwszym bądź lizynę w drugim przypadku (73).

Hb_{Lepore} , Hb_{Boston} , $\text{Hb}_{Lepore \text{ Hollandia}}$ i Hb_{Pylos} zawierają długie nieprawidłowe sekwencje aminokwasowe. Występują w nich całe odcinki łańcucha δ wbudowane w łańcuch β . Uważa się, że przyczyną tego jest *crossing over* w obrębie cistronów warunkujących sekwencję aminokwasów łańcuchów β i γ (15).

Hemoglobiny zwierzęce. Hemoglobiny krwi zwierząt wykazują zazwyczaj większe niż u człowieka zróżnicowanie u jednego osobnika. Różne hemoglobiny prawidłowe mogą u zwierząt występować w większych ilościach jako składniki główne, a nie drobne domieszki. Hemo-

Tablica 1

Różnice w budowie hemoglobin nieprawidłowych i hemoglobiny A

Typ hemoglobiny	Aminokwas		Pozycja w łańcuchu	Odnosnik literaturowy
	Hb A	Hb niepra- widłowa		
Zmiany łańcucha α				
I	Liz	Asp	16	16
G ^{Philadelphia}	Asp	Liz	68	„
O ^{Indonesia}	Glu	Liz	116	„
G ^{Honolulu} , G ^{Chinese}	Glu	Glu-NH ₂	30	„
Memphis	Glu	Glu-NH ₂	23	73
Mexico	Glu-NH ₂	Glu	54	16
Shimonoseki	Glu-NH ₂	Arg	54	„
J ^{Oxford}	Gli	Asp	15	„
J ^{Medellin}	Gli	Asp	22	„
Norfolk	Gli	Asp	57	„
L ^{Ferrara}	Asp	Gli	47	„
G ^{Paris}	Asp	?	6, 4, 74, lub 85	76
M ^{Boston}	His	Tyr	58	16
M ^{Ivate} , M ^{Kankakee}	His	Tyr	87	112
Chesapeake	Arg	Leu	92	30
Zmiany łańcucha β				
Hikari	Liz	Asp	61	16
N, Jenkins	Liz	Glu	95	34
D ^{Ibadan}	Tre	Liz	87	16
G ^{San Jose}	Glu	Gli	7	„
K ^{Ibadan}	Gli	Glu	41 lub 56	„
J ^{Melung} , J ^{Korat}				
J ^{Bangkok}	Gli	Asp	56	21, 30
G ^{Coushatta}	Glu	Ala	22	16
G ^{Galveston}	Glu	Ala	43	„
D ^{Punjab} , D ^{Chicago}	Glu	Glu-NH ₂	121	„
Seattle	Ala	Glu	70 lub 76	„
S	Glu	Wal	6	„
C	Glu	Liz	6	„
E	Glu	Liz	26	„
O ^{Arab}	Glu	Liz	121	„
Agenogi	Glu	Liz	90	81
Siriraj	Glu	Liz	7	16
M ^{Milwaukee}	Wal	Glu	67	„
Koeln	Wal	Met	98	29
G ^{Accra}	Asp	Asp-NH ₃	77	16
Tokuchi	His	Tyr	2	„
M ^{Saskatoon} , M ^{Radom}	His	Tyr	63	37, 83
M ^{Hamburg}				
Kenwood	His	Asp	143	16
Zurich	His	Asp	63	„

globina końska ma dwa składniki główne, zawierające jednakowe łańcuchy α , lecz różne β , kontrolowane przez odrębne geny. We krwi myszy występuje kilka hemoglobin, różniących się budową zarówno α jak i β łańcuchów (88, 90, 92). Owce homozygotyczne mają bądź hemoglobinę A, bądź B, heterozygotyczne zaś oba typy. Hemoglobiny te różnią się znacznie budową łańcuchów β (23). Łańcuchy α hemoglobin zwierzęcych zawierają przeważnie 141 a β — 146 aminokwasów, przy czym od ludzkich odróżnia je sekwencja aminokwasowa. Wydaje się, że zachodzą pewne prawidłowości zależności od gatunku. Zuckerkandl i wsp. (119, 121), badając „*fingerprint*” peptydowy hemoglobin małp obserwowali, że peptydy te różnią się zaledwie nieznacznie od peptydów hemoglobiny ludzkiej A. Duże podobieństwo wzajemne wykazują peptydowe produkty trawienia trypsyną hemoglobin przeżuwaczy. Również i „*fingerprinty*” peptydowe hemoglobin różnych gryzoni cechuje duża zbieżność. Oba te rodzaje różnią się znacznie między sobą i od krwi ludzkiej (25). W sekwencji aminokwasowej łańcuchów α i β oraz mioglobiny wiele aminokwasów zajmuje identyczne lub bliskie pozycje. Szczególnie duże podobieństwo zachodzi między mioglobina i łańcuchem α . We wszystkich prawidłowych hemoglobinach ludzkich łańcuchy α są identyczne, a w większości zwierzęcych wykazują dużą jednorodność i są mniej zróżnicowane niż β . Szereg danych wskazuje, że mioglobina i łańcuchy hemoglobin są produktem ewolucji jednej cząsteczki. Wydaje się, że różnice w sekwencji aminokwasowej hemoglobin u różnych gatunków zwierząt są wykładnikiem tego, w jakim czasie gatunki te oddzieliły się od wspólnego przodka (120).

2. Struktura przestrzenna hemoglobin

Struktura przestrzenna mioglobiny i hemoglobiny wyjaśniona została dzięki dokonanej przez Perutza i Kendrew analizie rentgenograficznej kryształów tych białek (32, 70, 71, 87). Istnieje ogromne podobieństwo wielkości i kształtu cząsteczki mioglobiny i łańcuchów hemoglobiny wszystkich gatunków ssaków i człowieka. W zbadanej przez Kendrew mioglobinie nasienia wieloryba łańcuch polipeptydowy jest ciasno zwinięty, tak że przekrój poprzeczny cząsteczki jest kolisty. Łańcuch tworzy naprzemian proste segmenty i pozaginane nieregularne odcinki. Około 70% łańcucha jest prawoskrętną α -spiralą. Wyróżnić można 8 odcinków spiralnych, tworzących proste segmenty cząsteczki, oraz 8 odcinków niespiralnych, leżących między nimi a także w C-końcowym odcinku łańcucha. Cztery reszty proliny umieszczone są w zagięciach łańcucha. Struktura jest bardzo zwarta, wewnątrz cząsteczki jest hydrofobowe i prawie pozbawione płynu. W kieszonce utworzonej przez łańcuch, blisko powierzchni, znajduje się hem. Fe^{2+} hemu połączone jest z resztą histydynową w pozycji 92, reszty propionowe z arginina. We-

wewnętrzna część hemu umieszczona blisko części łańcucha bogatej w aminokwasy aromatyczne otoczona jest ich hydrofobowymi łańcuchami bocznymi.

Łańcuchy α i β hemoglobiny końskiej i ludzkiej tworzą prawie regularny czworoscian. Każdy z łańcuchów zawiera 8 odcinków spiralnych, przedzielonych niespiralnymi. W odróżnieniu od mioglobiny w łańcuchach α i β N-końcowe odcinki mają budowę niespiralną, zaś C-końcowe — spiralną. Odcinki spiralne nadają cząsteczce jej zwartość i stabilność, ale jak się wydaje, są jej najmniej swoistymi miejscami. One właśnie wykazują największe podobieństwo wzajemne w łańcuchach, a podstawienie aminokwasów w hemoglobinach nieprawidłowych następuje znacznie częściej w odcinkach spiralnych niż niespiralnych (25).

Budowa trzeciorzędowa mioglobiny utrzymywana jest dzięki wiązaniom wodorowym struktury wtórnej oraz siłom van der Waalsa. Chociaż istnieją także wiązania jonowe między polarnymi grupami, są one jednak tak nieliczne, że zapewne nie odgrywają większej roli (69). Wydaje się bardzo prawdopodobne, że w cząsteczce hemoglobiny rzecz ma się podobnie.

Budowa łańcuchów α i β jest wzajemnie komplementarna. Łańcuchy różnoimienne przylegają ściśle do siebie, natomiast jednoimienne mają mało punktów stycznych i kontakt ich jest bardzo luźny. Wyniki badania chemicznego hemoglobiny i łatwość, z jaką cząsteczka rozpada się na podjednostki wskazują, że w utrzymaniu struktury czwartorzędowej nie biorą udziału wiązania kowalencyjne. Znacznie bardziej prawdopodobne jest, że cztery łańcuchy łączą się międzypeptydowymi wiązaniami jonowymi i wskutek różnych oddziaływań niejonowych. Większość polarnych łańcuchów bocznych w mioglobinie i przypuszczalnie w łańcuchach α i β leży na powierzchni, tak że zachodzi możliwość oddziaływań na dużych powierzchniach kontaktu między nieidentycznymi podjednostkami (25).

Cząsteczki hemoglobiny mają zdolność do rozpadania się na podjednostki w kwaśnym i zasadowym pH oraz w stężonych roztworach soli i mocznika (36, 49, 101). Masa cząsteczkowa maleje do połowy pierwotnej wartości. Produktem dysocjacji jest przypuszczalnie dimer, składający się z jednego łańcucha α i jednego β (9, 48). Wyniki badań nad hybrydyzacją łańcuchów przemawiały początkowo na korzyść powstawania asymetrycznych podjednostek α_2 i β_2 , ponieważ hybrydy powstałe przez przeprowadzenie dysocjacji dwu różnych hemoglobin z następną rekombinacją podjednostek zawierały zawsze po dwa jednakowe łańcuchy jednoimienne i nigdy nie otrzymano hybrydu o dwu różnych α czy β łańcuchach. Obecnie sądzi się jednak, że hybrydy powstają nie z dimerów, ale monomerów tworzących się wskutek dalszej dysocjacji cząsteczek (9, 47, 48). Obserwowano powstawanie produktów dysocjacji o niższym niż dimery ciężarze cząsteczkowym.

Wyniki badania struktury przestrzennej hemoglobiny promieniami rentgenowskimi są zgodne z danymi uzyskanymi drogą badań fizykochemicznych i analizy chemicznej łańcuchów. Własności hydrodynamiczne sugerują również kulisty kształt cząsteczki, a zawartość struktury spiralnej jest identyczna przy oznaczeniu jej rentgenograficznie i metodą pomiaru skręcalności optycznej (20). Kształt cząsteczki uwarunkowany jest kolejnością ułożenia aminokwasów. Niektóre z nich występują w identycznych lub bliskich miejscach łańcuchów we wszystkich hemoglobinach ssaków i te zapewne warunkują ich zbliżony kształt. Na przykład proliny znajdują się zawsze w zagięciach łańcucha, w odcinkach niespiralnych, przy ich przejściu w spiralne. Na kształt cząsteczki w dużej mierze wpływa też oddziaływanie między częścią białkową a grupą prostetyczną. I pod tym względem zachodzi duże podobieństwo między wszystkimi hemoglobinami — ułożenie hemu w łańcuchu, sposób wiązania, rodzaj i pozycja aminokwasów, z którymi się łączy są identyczne lub bardzo zbliżone.

3. Zmiany konformacyjne hemoglobiny

Konformacja cząsteczki hemoglobiny ulega ustawicznym zmianom i ta jej plastyczność warunkuje specyficzne zdolności funkcjonalne hemoglobiny. Zależności te są przedmiotem coraz liczniejszych badań. Rodzima globina różni się znacznie budową przestrzenną od hemoglobiny. Zmiana konformacji wywołana obecnością hemu warunkuje różnice we właściwościach cząsteczki. Własności fizykochemiczne i funkcjonalne cząsteczki rekombinowanej z natywnej globiny i protohemu są identyczne z rodzimą hemoglobiną, różne natomiast od globiny (6, 99). Hemoglobinę cechuje znacznie większa odporność na denaturację i trawienie enzymami proteolitycznymi niż globinę. Różnice występują też w ciężarze cząsteczkowym, punkcie izoelektrycznym, reakcjach z błękitem bromotymolowym i właściwościach immunochemicznych (12, 91, 98).

Konformacja cząsteczki hemoglobiny zależy też od stanu żelaza i zmienia się przy zmianie jego wartościowości lub przyłączeniu ligandu. Badania dyfrakcji rentgenowskiej cząsteczek ferrihemoglobiny, hemoglobiny i oksyhemoglobiny wykazały, że utlenienie, redukcja i utlenowanie grupy prostetycznej wywołują znaczne zmiany konformacyjne części białkowej (89). Wydaje się, że polegają one głównie na przemieszczeniu podjednostek względem siebie, a nie na innym zwinięciu poszczególnych łańcuchów, a więc są zmianami struktury czwartorzędowej. Największym przesunięciom ulegają łańcuchy β , które w zredukowanej hemoglobinie odsuwają się od siebie i oddalają od środka cząsteczki, przy czym odległość między hemami wzrasta (85). Badania dyspersji skręcalności optycznej wskazują, że zawartość struktury spiralnej nie zmienia się przy utlenowaniu hemoglobiny (26, 116). Zmiany struktury czwarto-

rzędowej, wywołane przyłączeniem ligandu pociągają za sobą zmiany właściwości cząsteczki. Jak wykazał H a u r o w i t z (50) w swym klasycznym doświadczeniu, kryształy oksyhemoglobiny ulegają rozpadowi po odłączeniu tlenu od cząsteczki. Po przyłączeniu ligandu zmienia się rozpuszczalność cząsteczek hemoglobiny, jej własności dielektryczne i lepkość. Obecność ligandu zmniejsza powinowactwo cząsteczki do substancji typu błękitu bromotymolowego (12, 77, 103). Reaktywność czynnej grupy SH wzrasta po utlenowaniu (18, 93). Zmienia się również wrażliwość na trawienie enzymami proteolitycznymi. Karboksypeptydazy trawią oksyhemoglobinę silniej niż hemoglobinę. Szczególnie duża różnica zachodzi w działaniu karboksypeptydazy A. Trawi ona łańcuch β , co potwierdza przypuszczenie, że ten właśnie łańcuch ulega zmianom konformacyjnym w czasie przyłączania ligandu (118).

Ze zmianami konformacyjnymi cząsteczki związane jest również tzw. oddziaływanie hem — hem. Nazwa ta, ogólnie przyjęta, nie oznacza jednak bezpośredniego działania między hemami. Mechanizm oddziaływania hem — hem polega przypuszczalnie na tym, że zmiana w grupie prostetycznej jednego z łańcuchów polipeptydowych powoduje zmianę konformacji innych, zmieniając tym samym ich właściwości. Oddziaływanie hem — hem zachodzić może nie tylko w obrębie jednej cząsteczki.

Związek funkcji hemoglobiny z jej zmianami konformacyjnymi omówiony zostanie w następnym rozdziale.

II. Reakcje hemoglobiny z ligandami

Dwuwartościowe żelazo w cząsteczce hemoglobiny ma zdolność odwracalnego wiązania szeregu ligandów: O_2 , CO, NO, CN^- , N_2 , alkiloizocyjanów i związków nitrozoaromatycznych. Wolny hem oraz chromogeny mogą również wiązać wymienione wyżej ligandy, z wyjątkiem tlenu. Nie wiadomo dokładnie w jaki sposób białko zapobiega samoutlenieniu żelaza w obecności tlenu, wydaje się jednak, że grupy hydrofobowe aromatycznych aminokwasów, leżących w otaczających hem odciśnięciach łańcuchów polipeptydowych tworzą hydrofobową barierę nie dopuszczającą do przeniesienia elektronów na żelazo (115).

Reakcje hemoglobiny z ligandami przebiegają w daleko bardziej skomplikowany sposób niż reakcje mioglobiny, czy też wolnych łańcuchów α i β . Jest to wynikiem obecności czterech centrów wiążących i czterech podjednostek w cząsteczce i oddziaływania między nimi. Obecność ligandu w jednym z hemów zmienia powinowactwo pozostałych, oraz kinetykę reakcji ligandu z nimi. Charakterystyczny kształt krzywej dysocjacji oksyhemoglobiny, efekt Bohra i inne zjawiska w reakcjach z ligandami spowodowane są oddziaływaniem hem — hem i zmianami struktury przestrzennej cząsteczki w czasie jej funkcji. W aspekcie

zmian konformacyjnych da się również wytłumaczyć interesujące spostrzeżenie G i b s o n a (40), że po raptownej dysocjacji CO od karboksyhemoglobiny, zachodzącej przy fotolizie błyskowej, hemoglobina łączy się z CO daleko szybciej niż w normalnych warunkach. Ta szybko reagująca forma hemoglobiny przechodzi następnie w zwykłą, o ile nie zostanie związana z tlenkiem węgla. Prawdopodobnie przy raptownym oddzieleniu ligandu hemoglobina nie nadąża z powrotem do wyjściowej konformacji i pozostaje w bardziej reaktywnej formie, jaką miała w połączeniu z ligandem.

1. Równowaga reakcji hemoglobiny z ligandami

Krzywa dysocjacji tlenu oksyhemoglobiny ma kształt sigmoidalny a nie hiperboliczny, jak w przypadku mioglobiny, co oznacza, że powinowactwo centrów wiążących do tlenu rośnie ze wzrostem nasycenia tlenem. Stąd wniosek, że obecność tlenu przy pierwszym hemie wzmacnia kolejno powinowactwo pozostałych, a więc zachodzi oddziaływanie hem — hem. Takie oddziaływanie, w którym powinowactwo do ligandu wzrasta, nazwano dodatnim. Przy ujemnym, powinowactwo do ligandu następnego z kolei centrum wiążącego maleje w porównaniu z poprzednim. Kształt krzywej dysocjacji hemoglobiny z innymi ligandami, łączącymi się z żelazem dwuwartościowym jest w zasadzie taki sam jak z tlenem, niezależnie od rodzaju ligandu. Wydaje się, że mechanizm oddziaływania hem — hem oparty jest we wszystkich przypadkach na tej samej zasadzie.

Sigmoidalny kształt krzywej dysocjacji ligandów obserwuje się we wszystkich hemoglobinach prawidłowych człowieka i innych ssaków, oraz w części hemoglobin patologicznych. Natomiast krzywa dysocjacji tlenu hemoglobiny H, posiadającej budowę β_4 ma kształt hiperboli. Jak stwierdzono, w cząsteczce tej hemoglobiny nie występuje oddziaływanie hem — hem (19), a jej utlenowanie nie powoduje też zmian konformacji białka (86). Również i otrzymany przez R a n n e y a i wsp. (90a) drogą hybrydyzacji składnik hemoglobiny zawierający jedynie łańcuchy α zachowuje się w obecności tlenu identycznie jak hemoglobina H. Zdaniem autorów dla prawidłowego funkcjonowania hemoglobiny konieczne jest oddziaływanie między różnoimiennymi łańcuchami i za minimalną jednostkę funkcjonalną uważają oni dimer α - β . Dimery takie mogą reagować z ligandami w ten sposób, że tylko jeden z łańcuchów związany jest z ligandem. Zdaniem A n t o n i n i e g o (4) dimery typu α x- β , lub β x- α są prawdopodobnie produktami pośrednimi reakcji hemoglobiny z ligandami.

Równowagi reakcji hemoglobiny z ligandami nie da się określić prostymi stałymi łączenia i dysocjacji, ponieważ nie odzwierciedlałyby one oddziaływania między centrami wiążącymi. Zazwyczaj stosuje się bądź

równanie Hilla (52), bądź czteroetapowy model Adaira (1), o którym będzie mowa później.

Równanie Hilla jest bardzo często stosowanym i użytecznym, choć empirycznym sposobem przedstawienia równowagi reakcji:

$$\frac{y}{(1-y)} = KX^n \quad \text{lub} \quad \frac{y}{(1-y)} = Kp^n$$

gdzie y jest cząstkowym nasyceniem hemoglobiny przez ligand, X aktywnością wolnego ligandu (oznaczoną jako p gdy ligand jest gazem), a K i n stałymi empirycznymi. To równanie nie ma bezpośredniego fizycznego znaczenia, ale zgadza się z danymi doświadczalnymi reakcji hemoglobiny z ligandami przy wartościach y pomiędzy 0,01 a 0,9. Wartości wyrażenia K lub $X^{1/2}$ (czy $p^{1/2}$), aktywności ligandu odpowiadającej połowicznemu nasyceniu, oraz n , mierzone gdy y jest bliskie $1/2$, służą do określenia powinowactwa do ligandu i kształtu krzywej równowagi. Wielkości te dają możliwość porównywania danych uzyskanych przy badaniu różnych hemoglobin i w różnych warunkach. Wielkość n charakteryzuje też oddziaływanie hem — hem i uważa się ją za wskaźnik ilości wzajemnie oddziaływujących centrów wiążących w cząsteczce.

W wypadku, gdy w cząsteczce jest tylko jeden hem (mioglobina i izolowane łańcuchy α i β) krzywa równowagi reakcji z ligandami ma kształt hiperboli, a $n = 1$ (5). Wartość n jest równa jedności również i w cząsteczkach o większej ilości hemów, gdy są one równoznaczne co do reaktywności, lecz niezależne od siebie. Wypadek taki ma miejsce w hemoglobinach niektórych niższych kręgowców i bezkręgowców (67, 78), a także w niektórych hemoglobinach zmodyfikowanych i nieprawidłowych, na przykład w hemoglobinie trawionej karboksypeptydazą A, w hemoglobinie H, α_4 , M_{14616} i innych (14, 51, 90a).

W wypadku, gdy w cząsteczce jest kilka równoważnych, lecz zależnych od siebie hemów o dodatnim oddziaływaniu hem — hem wartość n jest większa od jedności (117). Wartość ta jest do pewnego stopnia wskaźnikiem ilości hemów biorących udział w reakcji. Dla hemoglobin ssaków, w warunkach fizjologicznych w reakcji z tlenem wartość n wynosi około 3. Oznacza to, że ilość reagujących hemów wynosi co najmniej trzy, lub więcej. Wartości n uzyskane dla innych ligandów są zbliżone. Jak już wspomniano, przy modyfikacjach cząsteczki, zmniejszających oddziaływanie hem — hem i wpływających na zmiany konformacyjne łańcuchów, wartość n zmniejsza się. Dodatkowym czynnikiem zmniejszającym wartość n może być wzrost heterogeniczności układu, na przykład w mieszaninie różnych hemoglobin.

Na ogół zmniejszeniu wartości n towarzyszy wzrost powinowactwa całej cząsteczki do tlenu i innych ligandów. Wysokim powinowactwem odznacza się mioglobina, izolowane łańcuchy α i β i zmodyfikowane hemoglobiny. Wydaje się, że konformacja niezmienionej hemoglobiny

Wpływ modyfikacji hemoglobiny na jej równowagę tlenową (według 3, 5, 51, 90a)

Rodzaj modyfikacji	Grupy zmodyfikowane, zmiany pierwotne	Zmiany właściwości i konformacji	Wartość n z równania Hilla	Powinowactwo do tlenu p 1/2 w pH 7.0	Effekt Bohra: całkowita zmiana p 1/2 z pH
Normalna Hb Deutero-Hb	brak podstawienie grup winylowych przez wodór	brak zmniejszona stabilność kompleksu hem-białko, możliwe zmiany konformacyjne	2.9 1.7	$\log p1/2 = 1.05$ zwiększone (1.5—2 razy)	$\Delta \log p1/2 = 1.1$ normalny
Mezo-Hb	podstawienie grup winylowych przez etylowe	„	1.6	zwiększone (5—6 razy)	normalny
PCMB-Hb	podstawienie wolnych grup SH łańcuchów β	możliwe niewielkie zmiany konformacyjne	1.5	prawie normalne	prawie normalny
Acetylowana Hb	acetylowanie grup NH, SH i innych	zmniejszenie ciężaru cząsteczkowego, możliwe zmiany konformacji	2.5—1.3	zwiększone (10 razy)	prawie brak
Gwanidynowana Hb	podstawienie grup NH, przez gwanidynowe	możliwe zmiany konformacji	2.0	zwiększone (2 razy)	normalny
Fluoresceinowa Hb	trwały kompleks Hb z fluoresceiną	możliwe zmiany konformacji	1.2	zwiększone (5 razy)	prawie brak
6 M mocznik	rozzerwanie wiązań wodorowych i hydrofobowych	częściowe rozkładowanie łańcuchów	1.3	zwiększone (10 razy)	brak
5 M NaCl	wiązanie jonów, częściowe rozzerwanie wiązań hydrofobowych	zmniejszenie ciężaru cząsteczkowego do połowy	3.0	normalne	zmniejszony do 1/3
Trawienie karboksypeptydazą B	usunięcie argininy z C-końca łańcucha α	własności fizykochemiczne niezmienione	2.7	zwiększone (10 razy)	zmniejszony do 1/3
Trawienie karboksypeptydazą A	usunięcie histydyny i tyrozyny z C-końca łańcucha β	brak zmian konformacji przy utlenowaniu	1.0	zwiększone (30 razy)	zmniejszony do 1/3
Trawienie karboksypeptydazą A + B	usunięcie C-końców reszt obu łańcuchów	brak zmian konformacji przy utlenowaniu	1.0	zwiększone (50 razy)	brak
Hemoglobina H	cztery łańcuchy β	brak zmian konformacji przy utlenowaniu	1.0	zwiększone (30 razy)	brak
Hb α_4^A	cztery łańcuchy α	brak zmian konformacji przy utlenowaniu	0.94—0.98	zwiększone (100 razy)	brak
Hb M _{Ivate}	$\beta^{Tyr} \beta^A$	brak zmian konformacji przy utlenowaniu	1.0	zmniejszone	brak w pH 6.3—7.5 słaby w zasadowym
α SH	izolowane łańcuchy α		1.0	zwiększone (30 razy)	brak
β SH	izolowane łańcuchy β		1.0	zwiększone (50 razy)	brak

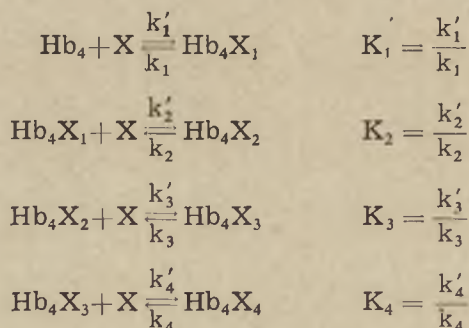
utrudnia dostęp ligandu do pierwszego hemu. Zmiana tej konformacji, której towarzyszy też zanik oddziaływania hem — hem podwyższa to powinowactwo (3, 103).

W tablicy 2 przedstawiono zmiany powinowactwa do tlenu, wartości n i efektu Bohra w zależności od zmian konformacji w zmodyfikowanych hemoglobinach.

Zmiany równowagi reakcji hemoglobiny z innymi ligandami zachodzą zwykle równolegle do obserwowanych przy reakcji z tlenem. Oddziaływanie hem — hem może zachodzić nie tylko w obrębie jednej cząsteczki. Na przykład przy rozpadzie hemoglobiny na podjednostki o połowie pierwotnego ciężaru cząsteczkowego wartość n i powinowactwo do tlenu nie zmienia się, co wskazuje na oddziaływanie między oddzielnymi podjednostkami w roztworze (7, 100, 102). Również i w hemoglobinie minoga wartość n jest większa niż jeden, chociaż w cząsteczce znajduje się tylko jeden hem (8, 27). Przy ujemnym oddziaływaniu hem — hem, gdy powinowactwo następnych centrów wiążących maleje, wartość n jest mniejsza niż jeden. Zjawisko to obserwuje się w hemoglobinach pewnych ryb. (97).

2. Kinetyka reakcji hemoglobiny z ligandami

W hemoglobinach ssaków reakcja z ligandami zachodzić może w czterech kolejnych etapach z utworzeniem związków pośrednich. Taki obraz reakcji przedstawia następujący schemat A d a i r a (1):



gdzie Hb_4 oznacza tetramer hemoglobiny, X — aktywność ligandu, K — stałą równowagi, k' — stałą szybkości tworzenia się związku, k — stałą szybkości jego dysocjacji. Zgodne z takim schematem okazały się wyniki późniejszych badań kinetyki reakcji hemoglobiny owczej z ligandami. (41, 45, 105).

Stałą szybkości przyłączenia się pierwszej cząsteczki ligandu (k'_1) oblicza się mierząc szybkość reakcji w pierwszych jej stadiach i ekstrapolując do czasu 0 (41). Stałą k'_4 mierzy się w aparacie do fotolizy błyskowej, odszczepiając fotochemicznie niewielką porcję przyłączonego li-

gandu, przy czym zakłada się, że rekombinacja zachodzi według schematu: $\text{Hb}_4\text{X}_3 + \text{X} \rightarrow \text{Hb}_4\text{X}_4$ (39). Inną metodą jest badanie fotolizą błyskową roztworu hemoglobiny, będącej w równowadze z dwoma ligandami, różniącymi się znacznie wrażliwością na fotolizę (41). Stałą dysocjacji czwartej cząsteczki ligandu — k_4 oznacza się w reakcjach, w których jeden ligand zastępuje się innym w warunkach pełnego nasycenia hemoglobiny. Stosując różne stężenia ligandu X przy znanym stężeniu ligandu Y mierzy się szybkość zastąpienia X przez Y (44). Stałe kinetyczne reakcji hemoglobiny owczej z różnymi ligandami zestawili Antonini (3).

Szybkość łączenia się ligandu z czwartym hemem (k'_4) przewyższa znacznie szybkość reakcji pierwszych trzech, co jak się zdaje warunkuje sigmoidalny kształt krzywej równowagi. Dotyczy to zarówno tlenu, jak i — wbrew pierwotnym przypuszczeniom — CO i innych ligandów. Stosunek k'_4/k'_1 który jest wykładnikiem oddziaływania hem — hem, wykazuje duże różnice przy reakcjach z różnymi ligandami, co może wskazywać na ilościowe jak i jakościowe różnice oddziaływania hem — hem w zależności od ligandu (42). Według hipotezy Paulinga przyłączeniu pierwszego ligandu towarzyszy zmiana konformacji pozostałych łańcuchów. „Rozluźnienie” struktury usuwa przeszkody przestrzenne i znacznie ułatwia dostęp następnych cząsteczek ligandu do centrów wiążących (38). Pogląd ten stoi jednak w pewnej sprzeczności z obecnymi wiadomościami, według których hemy leżą blisko powierzchni cząsteczki hemoglobiny.

3. Wpływ różnych czynników na równowagę reakcji hemoglobiny z ligandami

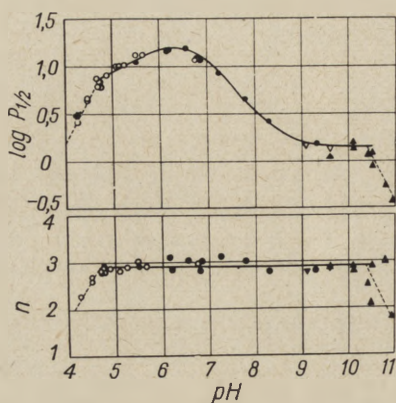
Wpływ pH — efekt Bohra. W hemoglobinach ssaków sigmoidalny kształt krzywej równowagi z tlenem pozostaje w zasadzie niezmienny przy różnych pH. Wartość n również nie zmienia się w zakresie pH od 5,0 do 10,0. Natomiast powinowactwo do tlenu zależne jest w dużej mierze od pH (rysunek 1).

Powinowactwo do tlenu, wyrażone jako $p^{1/2}$ z równania Hilla jest minimalne przy pH 6,0—6,5 i wzrasta silnie przy bardziej kwaśnym i bardziej zasadowym pH. Zjawisko to nosi nazwę efektu Bohra, przy czym zmiany w zakresie pH powyżej pH 6,5 określa się jako normalny, a poniżej — odwrotny efekt Bohra. Drugim aspektem efektu Bohra jest zależność powinowactwa hemoglobiny do jonów wodorowych od przyłączenia, czy też odszczepienia tlenu w grupie prostetycznej (rysunek 2).

Oba aspekty efektu Bohra mają wielkie znaczenie dla prawidłowej wymiany i transportu gazów, oraz regulacji tych procesów w różnych stanach fizjologicznych organizmu.

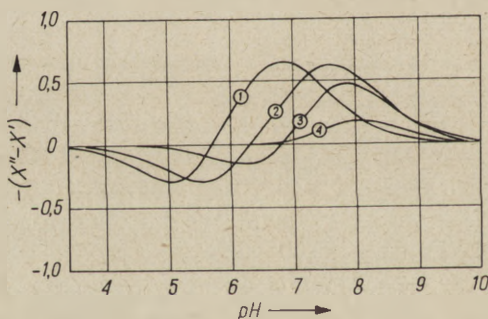
Efekt Bohra jest wyrazem funkcjonalnego współdziałania grup prostetycznych i jonizujących ugrupowań części polipeptydowej cząsteczki.

Powstaje pytanie, czy utlenowanie każdego z hemów ma ten sam wpływ na jonizację grup. Zdaniem Wymana zachowanie sigmoidalnego kształtu krzywej równowagi z tlenem w różnych pH sugeruje powiązanie funkcjonalne wszystkich czterech hemów z jonizacją takich samych grup w poszczególnych łańcuchach. Za tym, że utlenowanie każdego hemu ma ten sam wpływ na dane grupy przemawia również liniowa zależność



Rys. 1. Efekt Bohra i wartości n hemoglobiny ludzkiej w różnych buforach (według 13)

Stężenie hemoglobiny 3–5 mg/ml, t. 20°C. $\odot$ — w 0,2M fosforanie, $\circ$ — w 0,4M octanie, $\triangle$ — w 0,05M boranie, $\blacktriangle$ — w 0,4M mieszaninie glicyny i NaOH.



Rys. 2. Wartości ΔX jako funkcja pH (według 13)

Stężenie hemoglobiny 3–5 mg/ml, t. 20°C. X — ilość protonów związanych przez oksyhemoglobinę, X' — ilość protonów związanych przez hemoglobinę. Krzywa 1— $2,5 \times 10^{-3}$ fosforan. Krzywa 2—0,2M fosforan, 0,4M octan, 0,05M boran, lub 0,4M glicyna — NaOH bez dodatku soli. Krzywa 3—0,15M fosforan + 2M NaCl. Krzywa 4—0,15M fosforan + 5M NaCl.

między procentem wysycenia hemoglobiny tlenem a pobraniem protonów przez cząsteczkę (117). Natomiast wyniki doświadczeń Raugh tona i wsp. (105) wykonanych na hemoglobinie owczej przemawiają za istnieniem pewnych różnic w efekcie Bohra związanych z utlenowaniem poszczególnych hemów.

Zależność między powinowactwem do tlenu a zdolnością wiązania protonów wyraża następujące równanie:

$$\frac{\delta \log p_{1/2}}{\delta pH} = X'' - X' = \Delta X$$

gdzie X'' jest liczbą protonów związanych przez oksyhemoglobinę, X' — przez hemoglobinę, a $p_{1/2}$ — ciśnieniem O_2 przy połowicznym wysyceniu.

Równanie to można stosować, gdy kształt krzywej dysocjacji nie zmienia się w zależności od pH . Zgodność między wartością ΔX obliczoną ze zmiany powinowactwa do tlenu według tego równania, a mierzoną bezpośrednio wykazano dla hemoglobiny końskiej i ludzkiej, przy czym istnieje ona również w warunkach, gdy hemoglobina dysocjuje na dwie podjednostki — dimery (10, 11, 117).

Zagadnienie ilości grup jonizujących, ich budowa chemiczna i miejsce w łańcuchach polipeptydowych nie jest wciąż jeszcze wyjaśnione. Z wartości ΔX , która osiąga maksimum około 0.6 równoważnika na hem wnioskuje się, że w efekcie Bohra zaangażowana jest co najmniej jedna grupa jonizująca na cząsteczkę przyłączonego tlenu. Wydaje się, że w każdej z faz efektu Bohra tzn. tak w efekcie normalnym jak i odwrotnym bierze udział jedna grupa jonizująca. Zakładając udział dwu grup jonizujących w dwu fazach efektu Bohra, można obliczyć pH tych grup z równania.:

$$\log p_{1/2} = \text{stała} = \log \frac{(H^+ + K_1'')(H^+ + K_2'')}{(H^+ + K_1')(H^+ + K_2')}$$

gdzie K_1'' i K_2'' są stałymi dysocjacji obu grup jonizujących oksyhemoglobiny, a K_1' i K_2' — hemoglobiny. W ten sposób obliczono wartości pK dla grup jonizujących hemoglobiny ludzkiej i końskiej i okazało się, że jedna z grup ma charakter silniej, a druga słabiej kwasowy. Wartości pK grup jonizujących oksyhemoglobiny i hemoglobiny ludzkiej przedstawiono w tablicy 3.

Jak widać z tablicy 3 efekt Bohra zależy od stężenia soli w środowisku — zmniejsza się on z wzrostem siły jonowej, a przy $\Gamma/2$ równym 5 zanika zupełnie. W granicach $\Gamma/2$ pomiędzy 0,2—0,4 wartości pK obu grup jonizujących zmieniają się — jednej z 8,25 na 6,95, drugiej zaś z 5,30 na 5,90. Wartości ΔpK hemoglobiny końskiej są podobne do ludzkiej dla obu grup. Wydaje się, że w odwrotnym efekcie Bohra, w zakresie pH poniżej 5,5 bierze udział jeszcze jedna, pomocnicza grupa (10).

Początkowo obie grupy jonizujące uważane były za niezależne i nie oddziaływujące na siebie. Jednakże dane dotyczące hemoglobiny ludzkiej (2) oraz minoga (8) wskazują na możliwość oddziaływania wzajemnego między tymi grupami.

Tablica 3

Wartości pK grup jonizujących hemoglobiny ludzkiej wpływających na efekt Bohra ($t\ 20^\circ\text{C}$)
(według 13)

	$\Gamma/2$			
	$2.5-7.5 \times 10^{-3}$	0.15-0.4	2.2-2.5	5.2-5.5
Hemoglobina				
pK_1	7.71	8.25	8.29	8.16
pK_2	4.92	5.30	6.33	6.90
Oksyhemoglobina				
pK_1	6.17	6.95	7.28	7.80
pK_2	5.72	5.90	6.81	6.98
ΔpK_1	-1.54	-1.30	-1.01	-0.36
ΔpK_2	0.80	0.60	0.48	0.08

Budowa chemiczna grup warunkujących normalną i odwrotną fazę efektu Bohra nie jest jeszcze ostatecznie ustalona. W y m a n (117) przypuszcza, że w obu fazach chodzi o pierścień imidazolowy reszt histydynowych, ponieważ zakres pH , w którym występuje efekt Bohra jest identyczny z zakresem, w którym zachodzi dysocjacja grup imidazolowych, a ciepło jonizacji grup sprzężonych z utlenowaniem odpowiada ciepłu jonizacji grup imidazolowych (6000 cal). Również i wyniki B e n e s c h ó w (17), uzyskane przy badaniu wpływu N-etylomaleimidu na efekt Bohra potwierdzają hipotezę imidazolową. Jeżeli nawet grupami zaangażowanymi w efekt Bohra są reszty histydynowe, to nie chodzi tu o te, które wiążą się z żelazem hemu bezpośrednio. To samo wiązanie bowiem występuje w mioglobinie i pozostaje niezmiennione w wyizolowanych łańcuchach α i β , w których brak jednak efektu Bohra. Również i w tych hemoglobinach nieprawidłowych i zmodyfikowanych, w których efekt Bohra nie występuje (patrz tablica 2), wiązanie Fe^{2+} —histydyna jest nienaruszone. Nie jest też wykluczony udział innych grup w efekcie Bohra. Na podstawie badań wpływu temperatury na ten efekt powstała koncepcja, że w efekcie odwrotnym udział bierze grupa karboksylowa, w normalnym zaś — imidazolowa lub aminowa (11, 96).

Wydaje się, że dla efektu Bohra konieczny jest udział zarówno łańcuchów α jak i β . W hemoglobinie $\text{H}(\alpha_4)$ i α_4^A efekt Bohra nie występuje. R i g g s i H e r n e r (94) sugerują specjalne znaczenie i większy udział łańcuchów β .

Efekt Bohra nie jest zjawiskiem związanym wyłącznie z utlenowaniem hemoglobiny. Występuje on również przy reakcji hemoglobiny

z tlenkiem węgla, etyloizocyjankiem i innymi ligandami (63, 66). I przy tych ligandach kształt krzywej dysocjacji nie zależy od pH .

Skoro grupy warunkujące efekt Bohra są odległe od grup hemu i nie są z nim bezpośrednio związane, współdziałanie ich z hemem zachodzi prawdopodobnie za pośrednictwem zmian konformacji białka. W czasie denaturacji białka zachodzą duże zmiany pK grup jonizujących (113). Zmiana konformacji białka podczas utlenowania może pociągać za sobą zmianę oddziaływań elektrostatycznych pewnych grup i modyfikację wartości pK . Efekt Bohra zmniejsza się w stężonych roztworach soli, gdzie siły elektrostatyczne są znacznie zredukowane. Ponieważ w czasie utlenowania zmienia się głównie układ wzajemny łańcuchów, a nie ich budowa trzeciorzędowa, można przypuszczać, że efekt Bohra zachodzi wskutek oddziaływania grup umieszczonych na styku łańcuchów α i β . We wszystkich przypadkach znacznych zmian konformacji białka i zaniku oddziaływania wzajemnego między łańcuchami zanika i efekt Bohra. Wydaje się, że mechanizm tego tak ważnego dla prawidłowej funkcji hemoglobiny zjawiska polega na zmianach struktury przestrzennej cząsteczki (3).

Wpływ soli. Kształt krzywej równowagi hemoglobiny z tlenem oraz powinowactwo do tlenu zależne są od stężenia soli w środowisku. W niskich stężeniach soli kształt krzywej staje się mniej sigmoidalny, powinowactwo do tlenu wzrasta. Przy $\Gamma/2$ poniżej 1×10^{-4} wartość n jest niska (1,3—1,4), przy wzroście stężenia soli wzrasta do 3 i utrzymuje się na tym poziomie nawet w wysokich stężeniach, mimo dysocjacji hemoglobiny do dimerów (102). Przy stałej sile jonowej zmiany kształtu krzywej nie zależą od rodzaju jonów, natomiast powinowactwo do tlenu zmienia się w niejednakowym stopniu w obecności różnych jonów. Mechanizm działania soli na równowagę tlenową jest niejasny — możliwe, że w pewnej mierze zależy on od wiązania jonów przez grupy łańcuchów polipeptydowych związanych funkcjonalnie z procesem utlenowania.

Wpływ stężenia hemoglobiny. Kształt krzywej dysocjacji tlenu zmienia się nieco wraz ze zmianą stężenia hemoglobiny w roztworze. W bardziej rozcieńczonych roztworach kształt krzywej jest mniej sigmoidalny, powinowactwo do tlenu niższe (53). Wartość n w 0,5M fosforanie zmniejsza się z 3,3 do 2,5 przy rozcieńczeniu hemoglobiny z 6,5 do 0,25 mg/ml (104). Należy wziąć pod uwagę, że wszelkie pomiary reakcji przeprowadza się zwykle w rozcieńczonych roztworach, podczas gdy w krwinkach stężenie hemoglobiny osiąga 30%, co może w dużym stopniu zmieniać zachowywanie się hemoglobiny *in vitro*.

Wpływ temperatury. ΔH hemoglobiny ludzkiej, mierzone w zasadowym pH (gdzie ciepło jonizacji grup czynnych w efekcie Bohra jest minimalne) wynosi około -14 kcal na mol przyłączonego tlenu (11). Powinowactwo hemoglobiny do tlenu i innych ligandów zależy od tempera-

tury, i to nawet w przypadku modyfikacji cząsteczki, powodujących zmiany wartości n i p 1/2 (14, 103, 117).

Kształt krzywej równowagi tlenowej nie zmienia się w głównej swej części w zależności od temperatury, wydawało się więc, że ΔH jest jednokowe dla wszystkich hemów (117). Roughton i wsp. (105) obserwowali jednak niewielkie zmiany w skrajnych odcinkach krzywej równowagi hemoglobiny owczej z tlenem. Obliczenia dokonane na tej podstawie wykazały, że ciepło wiązania pierwszego hemu przewyższa średnią o około 5 kcal. ΔH_1 obliczone przez niego wynosi -15700 kcal, ΔH_2 — -11400 kcal, ΔH_3 -7800 kcal i ΔH_4 -8700 kcal. Może to oznaczać, że największe zmiany entropii związane są z przyłączeniem tlenu do pierwszego hemu i wtedy też zachodzą największe zmiany konformacyjne cząsteczki (77).

LITERATURA

1. Adair G. S., *J. Biol. Chem.* **63**, 529 (1925).
2. Alberty R. A., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 4522 (1955).
3. Antonini E., *Physiol. Rev.* **45**, 123 (1965).
4. Antonini E., Brunori M., Wyman J., Noble R., *J. Biol. Chem.* **241**, 3236 (1966).
5. Antonini E., Bucci E., Fronticelli C., Wyman J., Rossi-Fanelli A., *J. Mol. Biol.* **12**, 375 (1965).
6. Antonini E., Gibson Q. H., *Biochem. J.* **76**, 534 (1960).
7. Antonini E., Rossi-Fanelli A., Caputo A., *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 343 (1962).
8. Antonini E., Wyman J., Belleli L., Rumen N., Siniscalco M., *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 404 (1964).
9. Antonini E., Wyman J., Bucci E., Fronticelli C., Rossi-Fanelli A., *J. Mol. Biol.* **4**, 368 (1962).
10. Antonini E., Wyman J., Brunori M., Bucci E., Fronticelli C., Rossi-Fanelli A., *J. Biol. Chem.* **238**, 2950 (1963).
11. Antonini E., Wyman J., Brunori M., Bucci E., Fronticelli C., Rossi-Fanelli A., *Symposium on the Structure and Activity of Enzymes*, London 1964.
12. Antonini E., Wyman J., Moretti R., Rossi-Fanelli A., *Biochim. Biophys. Acta* **71**, 124 (1963).
13. Antonini E., Wyman J., Rossi-Fanelli A., Caputo A., *J. Biol. Chem.* **237**, 2773 (1962).
14. Antonini E., Wyman J., Zito R., Rossi-Fanelli A., Caputo A., *J. Biol. Chem.* **236**, PC 60 (1961).
15. Baglioni C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1880 (1962).
16. Beale D., Lehmann H., *Nature* **207**, 259 (1965).
17. Benesch R., Benesch R. E., *J. Biol. Chem.* **236**, 405 (1961).
18. Benesch R. E., Benesch R., *Biochemistry* **1**, 735 (1962).
19. Benesch R. E., Ranney H. M., Benesch R., Smith G. M., *J. Biol. Chem.* **236**, 2926 (1961).
20. Beychok S., Blout E. R., *J. Mol. Biol.* **3**, 769 (1961).

21. Blackwell R. Q., Chen Shen Liu, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **24**, 732 (1966).
22. Bookhin R., Nagel R., Ranney H. M., *J. Biol. Chem.* **242**, 248 (1967).
23. Boyer S. H., Hathaway P., Pascasio F., Orton Ch., Bordley J., Naughton M., *Science* **153**, 1539 (1966).
24. Braunitzer G., Gehring-Müller R., Hilschmann N., Hilse K., Hobom G., Rudloff V., Wittmann-Liebold B., *Z. Physiol. Chem.* **325**, 283 (1961).
25. Braunitzer G., Hilse K., Rudloff V., Hilschmann N., *Adv. Prot. Chem.* **19**, 1 (1964).
26. Briehl R. W., *Fed. Proc.* **21**, 72 (1962).
27. Briehl R. W., *J. Biol. Chem.* **238**, 2361 (1963).
28. Bucci E., Fronticelli C., *J. Biol. Chem.* **240**, PC 551 (1965).
29. Carell R. W., Lehmann H., Hutchinson H. E., *Nature* **210**, 915 (1966).
30. Clegg J. B., Naughton M. A., Weatherall D. J., *J. Mol. Biol.* **91**, 91 (1966).
31. Clegg M. D., Schroeder W. A., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 6065 (1959).
32. Cullis A. F., Muirhead H., Perutz M. F., Rossmann M. G., North A. C. T., *Proc. Roy. Soc. A* **265**, 161 (1962).
33. Dance N., Huehns E. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 444 (1962).
34. Dobbs N. B., Simmons J. W., Wilson J. B., Huisman T. H. J., *Biochim. Biophys. Acta* **117**, 492 (1966).
35. Engle R. J. Jr., Markey A., Pert A. H., Woods K. R., *Clin. Chim. Acta* **6**, 136 (1961).
36. Field E. O., O'Brien J. R. P., *Biochem. J.* **60**, 656 (1955).
37. Gehring-Müller R., Maunitzer R. G., Kleihauer E., Betke C., *Z. Physiol. Chem.* **345**, 181 (1966).
38. St. George R. C. C., Pauling L., *Science* **114**, 629 (1951).
39. Gibson Q. H., *J. Physiol. (London)* **134**, 123 (1956).
40. Gibson Q. H., *Biochem. J.* **71**, 293 (1959).
41. Gibson Q. H., Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry, red. J. A. Butler, B. Katz t. 9, 1959, str. 1.
42. Gibson Q. H., *Biochem. J.* **77**, 519 (1960).
43. Gibson Q. H., Heller P., Yakulis V., *J. Biol. Chem.* **241**, 1650 (1966).
44. Gibson Q. H., Roughton F. J. W., *Proc. Roy. Soc. B* **143**, 310 (1955).
45. Gibson Q. H., Roughton F. J. W., *J. Physiol. (London)* **163**, 6 P (1962).
46. Goldstein J., Konigsberg W., Hill R. J., *J. Biol. Chem.* **238**, 2016 (1963).
47. Guidotti G., Konigsberg W., Craig C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 47 (1963).
48. Guidotti G., Konigsberg W., Craig C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 774 (1963).
49. Hasserodt U., Vinograd J. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **45**, 12 (1959).
50. Haurowitz F., *Z. Physiol. Chem.* **254**, 266 (1938).
51. Hayashi N., Motokawa Y., Kikuchi G., *J. Biol. Chem.* **241**, 79 (1966).
52. Hill A. V., *J. Physiol. (London)* **40**, iv (1910).
53. Hill R., Wolvekamp H. P., *Proc. Roy. Soc. B* **120**, 484 (1936).
54. Huehns E. R., Dance N., Jacobs M., Beaven G. H., Shooter E. M., *J. Mol. Biol.* **12**, 215 (1965).
55. Huisman T. H. J., Dozy A. M., *J. Chromat.* **7**, 180 (1962).
56. Hunt J. A., *Nature* **183**, 1373 (1959).
57. Hunt J. A., Lehmann H., *Nature* **184**, 372 (1959).
58. Ingram V. M., *Nature* **178**, 792 (1956).
59. Ingram V. M., *Nature* **183**, 1795 (1959).

60. Ingram V. M., *Nature* **189**, 704 (1961).
61. Ingram V. M., Stretton A. O. W., *Nature* **190**, 1079 (1961).
62. Itano H. A., Singer S. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**, 522 (1958).
63. Joels N., Pugh L. G. C., *J. Physiol. (London)* **142**, 63 (1958).
64. Jones R. T., Schroeder W. A., Balog J. E., Vinograd J. R., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 3161 (1959).
65. Jones R. T., Schroeder W. A., Vinograd J. R., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 4749 (1959).
66. Kaziro K., Tsushima K., Hematin Enzymes, red. J. E. Falk, R. Lemberg, R. K. Morton, Pergamon Press, New York 1961, str. 80.
67. Keilin D., Wang Y. L., *Biochem. J.* **40**, 855 (1946).
68. Kekwick R. H., Lehmann H., *Nature* **187**, 158 (1963).
69. Kendrew J. C., *Brookhaven Symp. Biol.* **15**, 216 (1962).
70. Kendrew J. C., Dickerson R. E., Strandberg B. E., Hart R. G., Davies D. R., Philips D. C., Shore V. C., *Nature* **185**, 422 (1960).
71. Kendrew J. C., Watson H. C., Strandberg B. E., Dickerson R. E., Philips D. C., Shore V. C., *Nature* **190**, 666 (1961).
72. Konigsberg W., Hill R. J., *J. Biol. Chem.* **237**, 2547 (1962).
73. Kraus L., Miyati T., Iuchi J., Kraus A. P., *Biochemistry* **5**, 3701 (1966).
74. Kunkel H. G., Wallenius G., *Science* **122**, 288 (1955).
75. Labie D., Dreyfus J. C., Shapira G., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **47**, 1963 (1966).
76. Labie D., Shapira G., *Nature* **206**, 1033 (1966).
77. Lumry R., *Biophysics (Japan)* **1**, 138 (1961).
78. Manwell C., *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 194 (1960).
79. Marti H. R., Beale D., Lehmann H., *Acta Haematol.* **37**, 174 (1967).
80. Meyering C. A., Israels A. L. M., Sebens T., Huisman T. H. J., *Clin. Chim. Acta* **5**, 208 (1960).
81. Miyati T., Suzuki H., Ohba Y., Shibata S., *Clin. Chim. Acta* **14**, 624 (1966).
82. Muller C. J., Molecular Evolution, Van Gorcum, Assen 1961, str. 46.
83. Murawski K., Carta S., Sorcini M., Tentori L., Vivaldi G., Antonini E., Brunori M., Wyman J., Bucci E., Rossi-Fanelli A., *Arch. Biochem. Biophys.* **111**, 197 (1965).
84. Perutz M. F., Proteins and Nucleic Acids, Elsevier, Amsterdam, 1962.
85. Perutz M. F., Proc. Arden House Conf. Hemoglobin Harriman, New York, str. 217.
86. Perutz M. F., Mazzarella L., *Nature* **199**, 639 (1963).
87. Perutz M. F., Rossmann M. G., Cullis A. F., Muirhead H., Will G., North A. C. T., *Nature* **185**, 416 (1960).
88. Perutz M. F., Steirauf L. K., Stockell A., Bangham A. D., *J. Mol. Biol.* **1**, 402 (1959).
89. Perutz M. F., Trotter J. F., Howells E. R., Green D. W., *Acta Cryst.* **8**, 241 (1955).
90. Popp R. A., *J. Heredity* **53**, 142 (1962).
- 90a. Ranney H. M., Brieh R. W., Jacobs A. S., *J. Biol. Chem.* **240**, 2442 (1965).
91. Reichlin M., Gerstein J., Hay M., Levine L., *Fed. Proc.* **22**, 673 (1963).
92. Rifkin D. B., Rifkin M., Konigsberg W., *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 284 (1966).
93. Riggs A., *J. Biol. Chem.* **236**, 1948 (1961).
94. Riggs A., Herner A. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1664 (1962).
95. Robinson A. R., Robson M., Harrison A. P., Zuelzer W. W., *J. Lab. Clin. Med.* **50**, 745 (1957).

96. Rossi L., Chipperfield J. R., Roughton F. J. W., *Biochem. J.* **87**, 33P (1963).
97. Rossi-Fanelli A., Antonini E., *Nature* **186**, 895 (1960).
98. Rossi-Fanelli A., Antonini E., Caputo A., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 608 (1958).
99. Rossi-Fanelli A., Antonini E., Caputo A., *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 93 (1959).
100. Rossi-Fanelli A., Antonini E., Caputo A., *Nature* **183**, 827 (1959).
101. Rossi-Fanelli A., Antonini E., Caputo A., *J. Biol. Chem.* **236**, 391 (1961).
102. Rossi-Fanelli A., Antonini E., Caputo A., *J. Biol. Chem.* **236**, 397 (1961).
103. Rossi-Fanelli A., Antonini E., Caputo A., *Adv. Prot. Chem.* **19**, 73 (1964).
104. Rossi-Fanelli A., Wyman J., Antonini E., Caputo A., *Rend. Acad. Nazl. Lincei* **30**, 449 (1961).
105. Roughton F. J. W., Otis A. B., Lyster R. L. J., *Proc. Roy. Soc. B* **144**, 29 (1955).
106. Schnek A. G., Schroeder W. A., *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 1472 (1961).
107. Schroeder W. A., *Ann. Rev. Biochem.* **32**, 301 (1963).
108. Schroeder W. A., Cua J. T., Matsuda G., Fenninger W. D., *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 532 (1962).
109. Schroeder W. A., Jones R. J., Shelton J. R., Shelton J. B., Cormick J., McCalla K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 811 (1961).
110. Schroeder W. A., Shelton J. R., Shelton J. B., Cormick J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 284 (1962).
111. Schroeder W. A., Shelton J. R., Shelton J. B., Cormick J., Jones R. T., *Biochemistry* **2**, 992 (1963).
112. Shibata S., Iuchi I., Miyati T., *Nouv. Rev. Franc. Hematol.* **5**, 49 (1965).
113. Tanford C., *Adv. Prot. Chem.* **17**, 69 (1962).
114. Tyuma I., Benesch R., Benesch R. E., *Biochemistry* **5**, 2957 (1966).
115. Wang J. H., *Oxygenases*, red. O. Hayaishi, Academic Press, New York, str. 470.
116. Wolksztejn M. W., Szmelin A. B., *Biofizika* **11**, 773 (1963).
117. Wyman J., *Adv. Prot. Chem.* **4**, 407 (1948).
118. Zito R., Antonini E., Wyman J., *J. Biol. Chem.* **239**, 1804 (1964).
119. Zuckerkandl E., Jones R. T., Pauling L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 1349 (1960).
120. Zuckerkandl E., Pauling L., *Horizons in Biochemistry*, red. M. Kasha, B. Pullman, Academic Press, New York 1962, str. 189.
121. Zuckerkandl E., Schroeder W. A., *Nature* **192**, 984 (1961).

Nagrody przyznane w 1967 roku

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego z prawdziwą przyjemnością powiadamia czytelników o przyznaniu dorocznych nagród Towarzystwa:

Nagroda Imienia Bolesława Skarżyńskiego

w wysokości 3000 zł została przyznana dr JANUSZOWI BEEROWI, dr OLGIERDOWI ROŚKOWI oraz dr JANOWI SABLIŃSKIEMU za artykuł pt. „*Niektóre poliaminy alifatyczne i ich znaczenie biologiczne*” opublikowany w *Postęпах Biochemii*, 12, (1966).

Nagroda Imienia Jakuba Parnasa

w wysokości 4000 zł. została przyznana doc. dr KAROŁOWI TAYLOROWI za pracę doświadczalną pt. „*Physical and Chemical Changes of Vi-Polysaccharide due to Vi-Phage II Action*” opublikowaną w *Acta Biochimica Polonica* 13, 97 (1966).

KRYSTYNA KONOPKA*

Defekty enzymatyczne krwinek czerwonych

Enzymatic Defects of Red Cells

The enzymatic defects of erythrocytes concerning enzymes participating in the red blood cells metabolism are discussed.

Przyczyną pewnych zaburzeń metabolicznych krwinek czerwonych są defekty enzymatyczne. Dotyczy to głównie wrodzonych niedokrwistości hemolitycznych oraz wrodzonej methemoglobinemii. Brak enzymu lub upośledzenie aktywności enzymatycznej w chorobach dziedzicznych jest uwarunkowane genetycznie.

Defekty krwinek czerwonych można podzielić na trzy grupy:

1. defekty enzymów biorących udział w metabolizmie erytrocytów
2. defekty enzymów związanych z syntezą hemu
3. hemoglobinopatie — spowodowane nieprawidłową strukturą części białkowej Hb.

Niniejsza praca omawia pierwszą grupę defektów enzymatycznych obejmującą: I. wrodzone methemoglobinemie, II. wrodzoną niesferocytową anemię hemolityczną, III. wrodzony wysoki poziom ATP.

I. Wrodzone methemoglobinemie

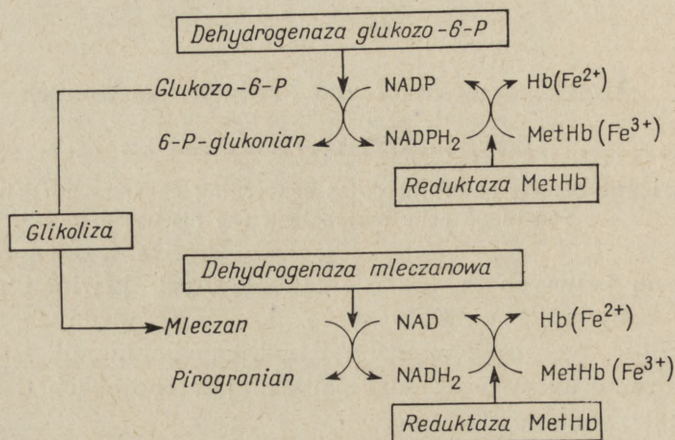
MetHb zawierająca Fe^{3+} nie jest zdolna do odwracalnego utlenowania. Poziom jej w warunkach fizjologicznych wynosi do 2% całkowitej ilości Hb. Powstawaniu MetHb przeciwdziałają dwa odrębne mechanizmy:

jeden zależny od swoistej budowy cząsteczki Hb, nadającej atomowi Fe^{2+} hemu szczególną odporność na działanie czynników utleniających (39)

i drugi o charakterze enzymatycznym, który stanowią dwa układy tak zwanych reduktaz MetHb, redukujące nieczynną MetHb do aktywnej pod względem oddechowym Hb (15). Noszą one nazwę układów stabilizacji Hb (33). Pierwszy z tych układów korzysta ze zredukowanego NADP jako donatora wodoru działając poprzez cykl pentozowy, drugi — ze zredukowanego NAD i jest związany z glikolizą (schemat 1).

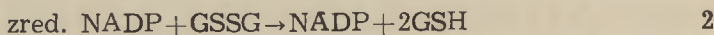
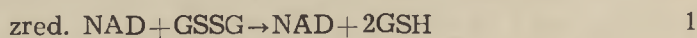
* Lek. med., mgr biochemii, Kierownik Działu Laboratoryjnego Stacji Krwiotawstwa w Łodzi.

W mechanizmie redukcji MetHb udowodniono także udział glutationu (36). GSH utrzymuje czynność metaboliczną wielu enzymów wymagających wolnych grup SH: heksokinazy, dehydrogenazy glukozo-6-P, dehydrogenazy 6-P glukonianu, dehydrogenazy fosfoglicerolaldehydu (16). W erytrocycie istnieją dwa enzymy redukujące GSSG:



Schemat 1. Redukcja MetHb według (44)

reduktaza zredukowany NAD:GSSG (reakcja 1) i reduktaza zredukowany NADP:GSSG (reakcja 2). Powodują one, że przeważająca część glutationu w erytrocytach występuje jako GSH.



Spadek aktywności reduktaz GSSG powodujący skłonność do methemoglobinemii może być wywołany dziedzicznym brakiem dehydrogenazy glukozo-6-P (4) lub wrodzonym defektem enzymatycznym erytrocytu przy prawidłowym poziomie tego enzymu (10).

Możliwość nieenzymatycznej redukcji MetHb przez GSH (reakcja 3)



jest zagadnieniem dyskusyjnym (15). Szeinberg i Clejan (52) donieśli o powstawaniu wiązań dwusiarczkowych podczas inkubacji Hb z GSSG według reakcji 4.



Reakcja ta zachodzi także w nienaruszonych erytrocytach.

Syntezą Hb i reduktaz MetHb kierują układy genetyczne, a wynikiem ich mutacji może być: nieprawidłowa budowa cząsteczki Hb oraz nieprawidłowa budowa lub zahamowanie syntezy reduktaz MetHb. Te genetyczne mutacje mogą naruszać naturalne mechanizmy chroniące Hb

przed utlenianiem do MetHb. Klinicznym następstwem tych defektów jest wrodzona sinica. Oba rodzaje zaburzeń dziedziczą się jako cechy autosomalne, jednak budowę cząsteczki Hb określają geny dominujące lub ściślej równorzędne (39), zaś wytwarzaniem reduktaz kierują geny recesywne. Zatem przy nieprawidłowej Hb sinica przekazywana jest z pokolenia na pokolenie, zaś przy braku jednej z reduktaz MetHb sinica w rodzinie obciążonej może nie ujawniać się przez wiele pokoleń, aż do momentu pojawienia się homozygoty recesywnej.

Methemoglobinemię spowodowaną odziedziczeniem nieprawidłowej odmiany Hb opisano po raz pierwszy w 1948 r. (18) w rodzinie niemieckiej. Od tego czasu wykryto kilka odmian nieprawidłowych Hb, które różnią się własnościami fizyko-chemicznymi, ale występują pod postacią MetHb. Obejmuje się je nazwą hemoglobin grupy M — w odróżnieniu od innych patologicznych odmian Hb, których przejawem klinicznym nie jest sinica lecz niedokrwistość hemolityczna. Nazwy znanych HbM zawierają w indeksie miejscowość rodzinną chorego lub szpitala np. HbM Chicago, HbM Boston itp. Występowanie HbM jest rzadkim zaburzeniem genetycznym. Na terenie Polski występuje uwarunkowana genetycznie nieprawidłowa odmiana HbM Radom (38), a w 1965 roku Murawski wykazał u dziecka z wrodzoną sinicą patologiczną HbM, której nadano nazwę HbM Warszawa.

Znacznie częstszą przyczyną wrodzonej methemoglobinemii jest brak aktywności jednego z dwóch układów reduktaz MetHb w erytrocytach, jednak liczba opisanych przypadków ogranicza się także do kilkudziesięciu. Zaburzenie to, dość częste w niektórych grupach ludnościowych, spotyka się również w naszej szerokości geograficznej (40). Sinica w methemoglobinemiach „enzymatycznych” jest objawem zależnym od wielu czynników zewnętrznych. Zawartość MetHb we krwi może wahać się od kilku do kilkudziesięciu procent całkowitej Hb.

1. Brak lub niedobór reduktazy zred. NADP:MetHb

Hu en n e k e n s i wsp. (19) stwierdzili, że utlenianie glukozy w dojrziałych erytrocytach zwiększa się 20 do 50 razy w obecności katalitycznych ilości błękitu metylenowego, co wskazywałoby, że utlenianie zred. NADP w krwince jest ograniczone przez niedobór donatora elektronów. Okazało się, że utlenianie glukozy w erytrocytach jest związane z redukcją MetHb i proces ten jest przyspieszany przez dodanie $10^{-5}M$ błękitu metylenowego. Hu en n e k e n s i wsp. (20) wyodrębnili reduktazę MetHb z ludzkich erytrocytów i wykazali, że grupą prostetyczną tego enzymu jest żelazoporfiryna. Końcowymi akceptorami elektronów mogą być: O_2 , MetHb lub cytochrom c, w obecności katalitycznych ilości błękitu metylenowego. Okresowe podawanie błękitu metylenowego może

korzystnie oddziaływać w przypadku wrodzonej methemoglobinemii, charakteryzującej się stałym wysokim poziomem MetHb w erytrocytach (powyżej 30%). Prawdopodobnie przy prawidłowej aktywności reduktazy zred. NADP:MetHb błękit metylenowy nie jest potrzebny, natomiast przy jej niedoborze spełnia rolę przenośnika elektronów ze zredukowanego NADP na MetHb zwiększając przemianę glukozy drogą cyklu pentożowego. Badania Scotta i wsp. (47) nad wrodzoną methemoglobinemią u Eskimosów i Indian z Alaski spowodowaną brakiem jednej z reduktaz MetHb potwierdzają te doniesienia. U pacjentów z wysokim poziomem MetHb jednorazowe dożylne podanie błękitu metylenowego (1mg/kg wagi ciała) powodowało spadek poziomu MetHb, który po kilku dniach powracał do wartości wyjściowej. Podobne objawy stwierdzono po doustnym stosowaniu dużych dawek kwasu askorbinowego. Autorzy sugerują, że methemoglobinemia u Eskimosów i Indian z Alaski jest wrodzona, ale procentowa zawartość MetHb podlega wpływom pewnych czynników zewnętrznych. Cecha dziedziczyła się w sposób recesywny. Nie stwierdzono występowania patologicznej Hb. Czynnikiem wpływającym na procentową zawartość MetHb może być kwas askorbinowy, stąd częste ujawnianie się tego defektu np. w grudniu. U osób spożywających duże ilości witaminy C methemoglobinemia może nie ujawnić się. Wszystkie opisane przez Scotta przypadki dotyczyły dzieci do lat 17. U dorosłych objawów nie stwierdzono. Oznaczenia procentowej zawartości MetHb u tej samej osoby na przestrzeni 8 lat sugerują zanikanie methemoglobinemii z wiekiem.

W Polsce opisano również (40) rodzinę, w której u 3 członków jednej generacji stwierdzono brak reduktazy zred. NADP:MetHb, dziedziczony jako cecha recesywna.

Ponieważ tylko około 10% całej glukozy zużywanej przez erytrocyt ulega przemianie w cyklu pentożowym, przeto brak reduktazy zred. NADP:MetHb powoduje mniejszy stopień methemoglobinemii niż deficyt reduktazy zred. NAD:MetHb związanej z przemianą glukozy drogą glikolizy.

2. Brak lub niedobór reduktazy zred. NAD:MetHb

Scott i wsp. (47, 48) wykazali, że u niektórych osób z wrodzoną methemoglobinemią nie ma flawoproteidowego enzymu, który powoduje redukcję MetHb z udziałem zredukowanego NAD jako substratu. Enzym ten działa w sposób wskazujący, że jest on reduktazą zred. NAD:MetHb, związaną z glikolizą. Jego wrodzony brak powodujący methemoglobinemię o zawartości 5—60% MetHb we krwi dziedziczy się jako cecha recesywna. Fakt, że pomimo braku tego enzymu część Hb pozostaje w stanie zredukowanym, tłumaczyć można działaniem reduktazy zred. NADP:MetHb oraz nieenzymatyczną redukcją MetHb (48).

3. Zaburzenia w syntezie glutationu

Townes i wsp. (54, 55) opisali rodzinę pacjenta z wrodzoną methemoglobinemią (5—6% MetHb) o dominującym, autosomalnym typie dziedziczenia. Ponieważ u osób tych nie stwierdzono patologicznej odmiany HbM, a aktywność obu reduktaz MetHb była prawidłowa, przyczyna tej rodzinie występującej methemoglobinemii musiała być inna.

Szczegółowe badania wykazały, że aktywności: katalazy, dehydrogenazy glukozy-6-P, dehydrogenazy fosfogliceroaldehydu i reduktazy GSSG w erytrocytach oraz zawartość nukleotydów pirydynowych były prawidłowe, natomiast znacznie obniżona była zawartość GSH (25 do 28 mg/100 ml erytrocytów) oraz poziom całkowitego glutationu. Stosunek GSH/GSSG był w normie. Test stabilności glutationu (4) był prawidłowy. Nie stwierdzono też zwiększonego rozpadu glutationu w organizmie, a wpływ egzogenego glutationu był minimalny. Ponieważ krwinki reagowały gwałtownie na błękit metylenowy obniżeniem poziomu MetHb, przypuszczano, że cykl pentozowy jest nietknięty, a defekt leży w drodze glikolitycznej. Inkubacja erytrocytów z mleczanem powodowała przyspieszoną redukcję MetHb, natomiast inkubacja z glukozą nie wywierała tego wpływu, co świadczyłoby o bloku metabolicznym pomiędzy glukozą i mleczanem na drodze Embden-Meyerhoffa. Przemawiała za tym niższa niż normalnie szybkość tworzenia się mleczanu po dodaniu glukozy do erytrocytów.

Najprawdopodobniej pierwotnie zaburzona jest synteza glutationu, którego niedobór powoduje w sposób pośredni methemoglobinemię. Ponieważ aktywność reduktazy zred. NAD:MetHb w erytrocytach jest prawidłowa — blok metaboliczny występuje przy tworzeniu się zredukowanego NAD w glikolizie. Źródłami zredukowanego NAD w glikolizie są zwłaszcza reakcje katalizowane przez dehydrogenazy mleczanową i fosfogliceroaldehydową. Aktywności obu tych enzymów były w normie. Dehydrogenaza fosfogliceroaldehydu do swojej aktywności wymaga jednak GSH, niski poziom glutationu obniża więc aktywność tego enzymu i zmniejsza szybkość tworzenia zredukowanego NAD, który jest substratem dla reduktazy methemoglobiny. Ponieważ obecność GSH jest niezbędna do aktywności całego szeregu enzymów, istnieje możliwość, że opisane zaburzenie ma bardziej wielokierunkowy mechanizm patogenetyczny.

II. Wrodzona niesferocytowa anemia hemolityczna

Wrodzona niesferocytowa anemia hemolityczna jest terminem, stosowanym do pacjentów cierpiących na wrodzony proces hemolityczny, którego nie można określić jako wrodzoną sferocytotę, talasemię, eliptycytozę lub jedną z hemoglobinopatii.

Dokładniejsze badania też różnorodnej grupy chorych, wyjaśniły, że wrodzona anemia hemolityczna może być spowodowana genetycznie uwarunkowanym niedoborem pewnych enzymów erytrocytu. Najlepiej poznane są defekty enzymatyczne polegające na braku lub niedoborze dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (3, 4, 5, 25, 26, 29, 31, 35, 41), kinazy pirogronianowej (6, 17, 42, 53), dwufosfogliceromutazy (43), oraz reduktazy GSSG (10).

Ponieważ brak każdego z trzech pierwszych enzymów prowadzi do spadku zawartości ATP w krwince czerwonej, zmniejszony poziom ATP jest prawdopodobnie istotnym czynnikiem patogenetycznym różnych typów wrodzonej anemii hemolitycznej. Szczegółowe badania tej grupy schorzeń rozpoczął w r. 1953 Dacie (11). Następnie opisano dalsze przypadki (53) i wyróżniono dwa typy wrodzonej niesferocytowej anemii hemolitycznej (17). Okazało się, że Typ I Dacie i Selwyn jest spowodowany niedoborem dehydrogenazy glukozy-6-P, a Typ II deficytem kinazy pirogronianowej (6, 35).

1. Brak lub niedobór dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu

Niedokrwistości spowodowane niedoborem tego enzymu są dużą grupą stosunkowo dobrze poznanych zaburzeń metabolizmu krwinki czerwonej.

Pierwsze przypadki ostrej anemii hemolitycznej występującej po leczeniu pamaguiną opisano w roku 1962 (5). W 1950 roku Alving i wsp. (1) stwierdzili, że nowy lek przeciwmurawicowy, primachina, wywołuje hemolizę wewnątrznaczyniową u około 10% Murzynów amerykańskich i 1% ludności białej. Derrn wykazał (12, 13), że hemoliza ta, ustępująca samoistnie pomimo dalszego stosowania primachiny, jest uwarunkowana wadą krwinek.

Inne pochodne anilinowe również wywołują hemolizę u osób wrażliwych na primachinę (5). Najsilniej działają dwie pochodne 8-aminochinoliny, które w dawce leczniczej przeciw zimnicy wyzwalają u osób wrażliwych ostry epizod hemolityczny (5). Z innych pochodnych anilinowych należy wymienić: sulfanilamid, tiazosulfon, sulfokson, fenacetynę, sulfacetamid, acetanilid i fenylohydrazynę. Podobnie działają: aspiryna, nitrofurantoina, salazopiryna, kwas *p*-aminosalicylowy, kwas salicylowy oraz hydroksyloamina. Również zjedzenie nasion lub wdychanie pyłków kwitnącego bobu (*Vicia Fava*) oraz infekcje wirusowe i bakteryjne mogą wywołać epizod hemolityczny u osób wrażliwych (29).

Ponieważ pierwsze spostrzeżenia i badania dotyczyły primachiny zespół ten najczęściej nazywa się anemią hemolityczną wrażliwą na primachinę, a erytrocyty określa się jako „wrażliwe na primachinę”.

W omawianych niedokrwistościach hemolitycznych, pierwotnie zaburzony jest cykl pentozowy, co pociąga za sobą odchylenie w przebiegu

glikolizy. Wada krwinek w tych schorzeniach polega na braku lub zmniejszeniu aktywności dehydrogenazy glukozy-6-P (10, 13, 29, 50, 51) katalizującej pierwszą reakcję cyklu pentozowego (schemat 1). Aktywność enzymu może wynosić 1/4—1/10 normy, a zmniejsza się jeszcze bardziej wraz ze starzeniem się krwinki (3, 7). Prowadzi to do wtórnego niedoboru zredukowanego NADP w erytrocytach, co powoduje upośledzenie: redukcji GSSG i MetHb, detoksykacji leków i biosyntezy — głównie kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej erytrocytu (7, 24).

Charakterystyczną cechą tych erytrocytów jest obniżona zawartość GSH a także znaczny spadek jego poziomu *in vivo* po podaniu leku hemolitycznego, wyprzedzający hemolizę o 2—4 dni oraz *in vitro* po inkubacji erytrocytów z tymi lekami (4, 5). Ostatnie spostrzeżenie stało się podstawą próby Beutlera (test stabilności glutationu) (5), która umożliwia wykrycie osób „wrażliwych na primachinę”. Polega ona na oznaczaniu GSH erytrocytów przed i po inkubacji z acetylofenylohydrazyną. W warunkach prawidłowych wyniki tych dwóch oznaczeń prawie nie różnią się od siebie, natomiast u osób wrażliwych poziom GSH po inkubacji obniża się o około 50%. Zdaniem Beutlera istnieje ścisły związek między zawartością GSH a wrażliwością krwinek na hemolizę. Erytrocyty nie ulegają hemolizie jeżeli stężenie wewnątrzkrwinkowego GSH nie spadnie poniżej 40% poziomu prawidłowego (14). Erytrocyty wrażliwe zawierają około 60% prawidłowej ilości GSH (3). Gdy krwinka taka zetknie się z substancjami, które zaburzają jej metabolizm i zwiększają zapotrzebowanie na zredukowany NADP, obniża się też poziom GSH, co w konsekwencji prowadzi do hemolizy. W erytrocytach z niedoborem dehydrogenazy glukozy-6-P obniżony jest poziom białkowych grup -SH. Jest to prawdopodobnie spowodowane reakcją pomiędzy Hb a GSSG (reakcja 4), która zapobiega nagromadzeniu się GSSG w erytrocycie i zmniejsza deficyt GSH (52). Jak już wspomniano aktywność dehydrogenazy glukozy-6-P maleje w miarę starzenia się krwinek, toteż na hemolityczne działanie leku wrażliwe są tylko starsze erytrocyty (2). Po zniszczeniu połowy krwinek hemoliza ustaje pomimo dalszego podawania leku (2, 4, 5), kryzys hemolityczny powoduje bowiem rzut młodej populacji krwinek, w których wprowadzić nie ma dehydrogenazy glukozy-6-P, ale zawartość GSH jest prawidłowa. W okresie nasilonej retikulocytozy poziom GSH i aktywność enzymu rosną, nie osiągają jednak wartości prawidłowych i mniej więcej po miesiącu powracają do niskich wartości wyjściowych (5).

Leki wywołujące hemolizę mogą powodować niedobór zredukowanego NADP przez hamowanie reakcji, w których on powstaje, albo przez zwiększenie zapotrzebowania na ten koenzym (51).

Stwierdzono, że leki te hamują aktywność dehydrogenazy glukozy-6-P oraz, że utleniają zredukowany NADP, Hb i białka erytrocytu. Morfologicznym wyrazem zmian jest pojawianie się ciałek Heinzów. W miarę

nasilania się hemolizy liczba ciałek Heinza zmniejsza się, gdyż młode krwinki są odporne na ich tworzenie (3). Nie wiemy w jaki sposób leki wywołujące hemolizę będąc związkami redukującymi utleniają składniki erytrocytu. Przypuszcza się, że zachodzi początkowo ich utlenianie przez OksyHb.

W erytrocytach „wrażliwych na primachinę” stwierdzono zmniejszoną aktywność katalazy, co może przyczyniać się do utlenienia Hb i innych składników krwinki przez H_2O_2 (25). Erytrocyty z niedoborem dehydrogenazy glukozy-6-P są bardziej wrażliwe na H_2O_2 (35). Jeżeli lek utleniający powoduje powstawanie w krwinkach H_2O_2 , to przy obniżonej aktywności katalazy i peroksydazy glutationu (wobec niskiego poziomu GSH w erytrocytach wrażliwych) może dojść do hemolizy.

W krwinkach tych stwierdzono 1,5 do 2 razy wyższą aktywność reduktazy GSSG, nie zmieniającą się po podaniu leku hemolitycznego (46). Wysoka aktywność tego enzymu może zmniejszać deficyt GSH, nie zapobiega jednak hemolizie, kiedy krwinka znajduje się *in vivo* pod działaniem leków hemolitycznych.

Starzenie się krwinki czerwonej w zwykłych warunkach jest związane z utlenianiem się Hb i innych składników komórkowych. Krwinki nie zawierające dehydrogenazy glukozy-6-P starzeją się przedwcześnie (7, 23) a ich okres przeżycia nawet bez podania leku hemolitycznego może być nieco krótszy. Niedokrwistość jednak nie rozwija się dzięki wyrównawczemu wzrostowi hematopoezy (7).

Motulski (37) uważa, że śmiertelność z powodu zimnicy jest mniejsza u osób z brakiem dehydrogenazy glukozy-6-P w erytrocytach. Ponieważ pasożyty malarii posługują się głównie pentozową drogą metabolizmu i do rozwoju wymagają glutationu (cysteiny), warunki ich wzrostu są więc gorsze w takich krwinkach (29).

Klinicznie można odróżnić cztery postacie niedokrwistości hemolitycznej u osób z niedoborem dehydrogenazy glukozy-6-P w krwinkach czerwonych: niedokrwistości hemolityczne polekowe, fawizm, wrodzoną niesferocytową niedokrwistość hemolityczną, niedokrwistości hemolityczne w przebiegu zakażeń wirusowych i bakteryjnych.

W niedokrwistości hemolitycznej polekowej objawy hemolizy pojawiają się po 2—3 dniach od przyjęcia leku. Poziom Hb obniża się szybko, zmniejsza się liczba krwinek czerwonych i hematokryt, wzrasta retikulocytoza, w wielu krwinkach pojawiają się ciałka Heinza. Jeżeli nawet nie przerwie się podawania leku, ostra faza hemolityczna mija po około 8 dniach. Po 3—4 tygodniach obraz krwi obwodowej staje się prawidłowy i nie stwierdza się żadnych objawów chorobowych, mimo dalszego stosowania leku. Wrażliwe na działanie leku starsze erytrocyty niszczone są bowiem w ciągu 1 tygodnia, a w krążeniu pozostają młode niewrażliwe krwinki, które są stopniowo niszczone po przeżyciu około 60 dni. Ponieważ tylko niewielki odsetek krwinek czerwonych ulega dzien-

nie rozpadowi, zjawisko to może być klinicznie nieuchwytnie. Ta tolerancja na lek trwa kilka tygodni po jego odstawieniu. Kilkakrotne zwiększenie dawki leku może wyzwoić ponowny cykl hemolityczny w okresie tolerancji na poprzednie dawki.

W roku 1965 Maj (30) przedstawił wyniki badań nad częstością występowania niedoboru dehydrogenazy glukozo-6-P w erytrocytach w populacji polskiej. Wśród 93 przypadków niedokrwistości hemolitycznych wrodzonych i nabytych stwierdzono niedobór tego enzymu u 4 osób: w 1 przypadku fawizmu (31) i w 3 przypadkach wrodzonej niesferocytowej anemii hemolitycznej, co stanowiło 2,3% badanych. Częstość występowania tej cechy w populacji polskiej jest jednak mniejsza, ponieważ w badanej grupie 52,9% stanowiły niedokrwistości hemolityczne, w przebiegu których istnieje największe prawdopodobieństwo występowania niedoboru dehydrogenazy glukozo-6-P (30).

Fawizm występuje głównie u dzieci na Sycylii i w południowych Włoszech. Początek hemolizy jest nagły. Pierwsze objawy po wdychaniu pyłków *Vicia Fava* występują już po kilkunastu minutach, a po zjedzeniu świeżego bobu po 24 godz. Przebieg choroby jest gwałtowniejszy. Objawami są: gorączka, osłabienie, żółtaczka hemolityczna, hemoglobinuria oraz powiększenie śledziony. Szybko postępująca hemoliza może doprowadzić do śmierci. Po ostrym napadzie „odporność” trwa około 6 tygodni.

Vullo i Ponizon (56) stwierdzili, że krwinki czerwone osób chorujących na fawizm posiadają krótszy okres przeżycia po przetoczeniu ich zdrowym biorcom.

W roku 1964 Maj i wsp. (31) opisali przypadek fawizmu w rodzinie polskiej. U pacjenta stwierdzono brak dehydrogenazy glukozo-6-P, obniżoną aktywność katalazy, spadek GSH do zera w teście stabilności i zwiększoną tendencję do tworzenia ciałek Heinza. U matki i jednej z córek pacjenta wykazano nieznaczny niedobór dehydrogenazy glukozo-6-P, ponadto u matki — spadek GSH o 39,5% w teście stabilności, oraz zwiększoną tendencję do tworzenia ciałek Heinza. Jest to zgodne z wynikami Mohlera i wsp. (35), którzy wykazali u kobiet heterozygot dużą różnorodność stopnia deficytu tego enzymu i wyników testu stabilności glutationu.

Jako wskaźnik niedoboru dehydrogenazy glukozo-6-P używano też testu redukcji MetHb (35). Jest to pośrednie oznaczenie aktywności tego enzymu ponieważ w obecności błękitu metylenowego MetHb ulega początkowo redukcji pod wpływem reduktazy zredukowanego NADP:MetHb, a przy niedoborze dehydrogenazy glukozo-6-P odtwarzanie zredukowanego NADP jest upośledzone. Na podstawie obniżonej redukcji MetHb zidentyfikowano kobiety heterozygotyczne w 80%.

Wrodzona niesferocytowa niedokrwistość hemolityczna nie jest związana z przyjmowaniem leków. Skrócenie okresu przeżycia „erytrocytów

wrażliwych” w okresie nie przyjmowania primachiny upodabnia ją do niektórych innych przypadków wrodzonych, niesferocytowych niedokrwistości hemolitycznych, od których odróżnia się ona bardziej nasiloną hemolizą, nie wyrównaną wzrostem hematopoezy (7). Należy dodać, że nie we wszystkich przypadkach tej niedokrwistości stwierdzono obniżenie aktywności dehydrogenazy glukozy-6-P i zaburzenia metabolizmu GSH. Obniżenie aktywności tej dehydrogenazy w erytrocytach występuje w większości przypadków tzw. idiopatycznej choroby hemolitycznej i *kernicterus* noworodków bez konfliktu serologicznego (39).

Badając naturę defektu w erytrocytach „wrażliwych na primachinę” próbowano stwierdzić czy erytrocyty te charakteryzują się niskim poziomem ATP. Mohler i wsp. (35) zaobserwowali, że inkubacja erytrocytów „wrażliwych” z glukozą powoduje wyraźny spadek ilości ATP, który koreluje ze stopniem niedoboru dehydrogenazy glukozy-6-P. Zaobserwowali oni także obniżenie ilości ATP w erytrocytach w czasie inkubacji z primachiną lub fenylohydrazyną, co tłumaczą uszkodzaniem błony komórkowej krwinki przez fenylohydrazynę zarówno bezpośrednio jak i poprzez wytwarzanie H_2O_2 . Uszkodzona błona staje się bardziej przepuszczalna dla Na^+ i K^+ , co prowadzi do wzrostu aktywności pompy $Na^+—K^+$. Ponieważ energia potrzebna do działania pompy $Na^+—K^+$ pochodzi z ATP, zwiększone zużycie ATP może przekroczyć jego syntezę. Jeżeli poziom ATP spadnie poniżej wartości krytycznej, wymagania energetyczne komórki nie są zaspokajane i wzrasta szybkość jej rozpadu. Spadek zawartości ATP w erytrocycie skraca przeżycie krwinek *in vitro* i *in vivo* i może być ważnym czynnikiem w patogenezie procesów hemolitycznych (35).

Rozważania powyższe są zgodne z danymi Robinson i wsp. (45), którzy badali wrodzone niesferocytowe anemie hemolityczne. Rozdzielali oni związki fosforowe frakcji kwasorozpuszczalnej erytrocytów metodą chromatografii jonowymiennej (1) i badali ich zachowanie się po inkubacji z ^{32}P . W erytrocytach z niedoborem dehydrogenazy glukozy-6-P wykazano 0,63 μM ATP/ml erytrocytów. Ponieważ jednak we krwi obwodowej stwierdzono 15% retikulocytów, które zawierają od 1,5 do 2 razy więcej ATP niż dojrzałe krwinki, poziom ATP w dojrzałych erytrocytach jest prawdopodobnie jeszcze niższy (28). U tej samej osoby zawartości innych nukleotydów i związków fosforowych przedstawiały się następująco w μM /ml erytrocytów): AMP—0,04; ADP—0,23; 2,3-dwufosfoglicerynian — 4,87; heksozodwufosforan — 0,46 i P_i — 0,42. Podczas inkubacji erytrocytów z ^{32}P zaobserwowano wyraźny spadek ATP i 2,3-dwufosfoglicerynianu, mniej wyraźny spadek heksozodwufosforanu i ADP oraz gwałtowny wzrost P_i . Ponieważ jednocześnie względna aktywność specyficzna z ^{32}P dla heksozodwufosforanu i 2,3-dwufosfoglicerynianu jest mniejsza niż normalnie, autorzy sugerują, że krwinka ma zmniejszoną zdolność syntezy tego ostatniego i że defekt

polega na zaburzeniu glikolizy, mianowicie obniżony poziom ATP ogranicza aktywność heksokinazy.

Brewer (8, 9) opisał wprawdzie przypadek niedoboru dehydrogenazy glukozy-6-P przy dwukrotnie zwiększonym poziomie ATP w krwinkach czerwonych, ale obie anomalie dziedziczyły się jako cechy niezależne, co wskazuje na istnienie jednocześnie dwóch defektów enzymatycznych w erytrocycie.

Można zatem przyjąć, że opisana tu wrodzona niesferocytowa anemia hemolityczna jest spowodowana pierwotnym brakiem dehydrogenazy glukozy-6-P, co wtórnie wywołuje niedobór zred. NADP, a następnie zmniejszenie poziomu GSH i ATP w erytrocycie. Zmniejszona zawartość ATP hamuje aktywność heksokinazy, upośledzając zużycie glukozy na drodze glikolizy, a obniżony wskutek tego poziom 2,3-dwufosfoglicerynianu pogłębia już istniejący niedobór ATP.

W opisywanym defekcie, pomimo niedoboru zred. NADP, nie stwierdzono wyraźnej methemoglobinemii prawdopodobnie dlatego, że z jednej strony aktywność reduktazy zred. NAD:MetHb jest prawidłowa, z drugiej strony zaś występująca hemoliza krwinek nie pozwala na ujawnienie się methemoglobinemii.

Brak dehydrogenazy glukozy-6-P w erytrocytach jest genetycznie uwarunkowany i dziedziczony jako związana z chromosomem x cecha z niepełną dominacją. W wyniku mutacji genów możliwe są u mężczyzn dwa stany: prawidłowy lub z wadą zależną od mutacji, a u kobiet trzy: homozygota normalna oraz heterozygota i homozygota zależna od mutacji.

Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-P w erytrocytach „wrażliwych” Murzynów wynosi 10 do 15% aktywności prawidłowej. U „wrażliwej” ludności białej aktywność enzymu jest bardzo mała lub równa 0, przy czym poziom enzymu jest również obniżony w leukocytach, płytkach i innych tkankach (32).

Omawiana cecha jest szeroko rozpowszechniona, zwłaszcza w zimnych rejonach świata: tropikalna Afryka, rejon Morza Śródziemnego, Filipiny, Bliski Wschód, Azja Płd. Występuje również u około 10–15% Murzynów amerykańskich. Wadę tę wykryto między innymi na przykład u 10% ludności Nigerii, 3–8% ludności Indii, 12,4% — Filipin, 2% — Chin, 8,5% — Iranu, 11,2% — Izraela, 10% — Greków, 13,1% ludności Sardynii, 16% — Indian Płd. Ameryki. Bardzo rzadko spostrzegano to zaburzenie wśród ludności białej Ameryki Płn. (1%), w Europie i w Japonii.

Fawizm występuje głównie w rejonie Morza Śródziemnego, a wrodzona niesferocytowa niedokrwistość hemolityczna u ludności północno-europejskiej (29, 31).

Omawiane wrodzone anemie hemolityczne są dość różnorodną grupą schorzeń, mogą tu występować połączenia kilku defektów enzymatycz-

nych u tego samego osobnika. Neiman i wsp. (41) opisali wrodzoną methemoglobinemię, dziedziczną jako autosomalna cecha recesywna, z jednoczesnym deficytem dehydrogenazy glukozy-6-P i talasemią minor. Nie stwierdzono wpływu talasemii na methemoglobinemię, natomiast niedobór enzymu pogłębiał methemoglobinemię blokując cykl pentozowy.

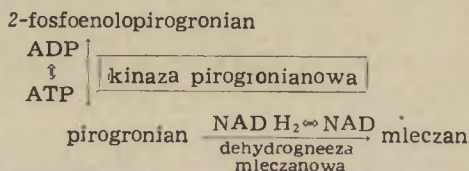
2. Brak lub niedobór kinazy pirogronianowej

Wrodzoną anemię hemolityczną spowodowaną deficytem tego enzymu opisano (17, 53) jako II Typ niedokrwistości według Dacie i Selwyn. Charakterystyczną jej cechą jest znaczna autohemoliza odwiłkowanej, jałowej krwi, która nie zmniejsza się po dodaniu glukozy, ale ustępuje pod wpływem ATP.

W erytrocytach tych zauważono niski poziom ATP, bardzo niskie zużycie glukozy oraz nagromadzenie się podczas inkubacji z glukozą dużej ilości ufosforylowanych związków pośrednich glikolizy (17).

Tanaka i wsp. (53) wykazali obniżoną aktywność kinazy pirogronianowej w tych erytrocytach. W młodych krwinkach aktywność była nieco większa, a w leukocytach w normie. Niedobór kinazy można było uzupełnić dodaniem krystalicznego enzymu, co przemawia za brakiem inhibicji. Aktywności innych enzymów erytrocytów np. dehydrogenaz glukozy-6-P czy mleczanu były prawidłowe. Badania rodzin pacjentów wskazują na autosomalne dziedziczenie recesywne, przy czym u heterozygot stwierdzono obniżenie aktywności enzymu bez objawów klinicznych.

Kinaza pirogronianowa katalizuje reakcję przedstawioną na schemacie 2.



Schemat 2. Reakcja katalizowana przez kinazę pirogronianową

Znaczny deficyt kinazy pirogronianowej powodować może zaburzenia w przemianie energetycznej erytrocytu, co może zwiększać hemolizę.

Bowman i Procopio (6) opisali pięcioro dzieci z pięciu rodzin z niedoborem kinazy pirogronianu. Objawy były podobne do hemolitycznej choroby noworodków spowodowanej niezgodnością czynnika Rh. Czas przeżycia erytrocytów był skrócony, także po przetoczeniu do krwi osobników zdrowych. Inne wyniki są zgodne z badaniami Tanaki i wsp. (53). Poza objawami związanymi ze zwiększoną hemolizą występowały bardzo wyraźne zniekształcenia w budowie kości czaszki. Co-fanie się zmian kości czaszki po splenektomii może sugerować pewien

wpływ śledzony na przebieg schorzenia. Prawdopodobnie patogenezę opisywanych tu przypadków jest bardziej złożona.

Robinson i wsp. (45) badając związki fosforowe frakcji kwaso-rozpuszczalnej erytrocytów z niedoborem kinazy stwierdzili obniżoną zawartość ATP (biorąc pod uwagę retikulocytozę) oraz zwiększony poziom 2,3-dwufosfoglicerynianu (do $9 \mu\text{M/ml}$ erytrocytów), heksozodwufosforanu, P_i i P całkowitego. Podczas inkubacji z ^{32}P występował duży spadek zawartości ATP, utrzymywał się natomiast wysoki poziom 2,3-dwufosfoglicerynianu.

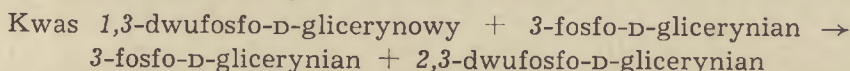
Uzyskane wyniki sugerują, że blok metaboliczny znajduje się za miejscem syntezy 2,3-dwufosfoglicerynianu wskutek czego wytwarzany związek nie jest zużywany, a poziom ATP obniża się. Również Oski i Diamond (42) stwierdzili u trzech pacjentów z wrodzonym niedoborem kinazy pirogronianowej obniżony poziom ATP malejący dalej podczas inkubacji. U dwóch osobników z niedoborem kinazy następował spadek zawartości NAD podczas inkubacji.

3. Niedobór reduktazy GSSG

Carson i Brewer (10) opisali pacjenta, u którego w ciągu 15 lat wystąpiła siedem razy niedokrwistość hemolityczna po podaniu pochodnych 8-aminochinoliny. Poziom dehydrogenazy glukozy-6-P w erytrocytach był prawidłowy, natomiast aktywność reduktazy GSSG była obniżona do 57% normy. Zawartość GSH była niska, przy prawidłowym teście stabilności. Wskazywało to na nowy rodzaj wrodzonej anemii hemolitycznej indukowanej lekami przeciwnowotworowymi. Opisano także przypadek anemii hemolitycznej wywołanej sulfoxonem u chorego z obniżoną aktywnością reduktazy GSSG. Prawdopodobnie całkowity brak tego enzymu jest letalny. Obniżona aktywność reduktazy GSSG w erytrocycie pociąga za sobą spadek zawartości GSH i wszystkie konsekwencje z tym związane, co może powodować *in vivo* hemolizę po podaniu leków.

4. Niedobór dwufosfogliceromutazy

Zmniejszona aktywność dwufosfogliceromutazy (43) jest rzadko spotykanym defektem enzymatycznym krwinki czerwonej. Enzym ten katalizuje następującą reakcję:



Obniżenie jego aktywności powoduje brak w erytrocycie 2,3-dwufosfoglicerynianu, który jest koenzymem fosfomutazy fosfoglicerynianowej przeprowadzającej 3-fosfo- w 2-fosfoglicerynian (16). Hamuje to reakcje glikolizy poniżej tego miejsca i ogranicza wytwarzanie ATP. Spadek poziomu ATP jest prawdopodobnie przyczyną zwiększonego rozpadu erytrocytów z niedoborem dwufosfogliceromutazy i hemolizy.

III. Wrodzony wysoki poziom ATP

Jak już wspomniano, Brewer (8) zauważył wysoki poziom ATP w erytrocytach osobnika z niedoborem dehydrogenazy glukozo-6-P. Okazało się, że zwiększony poziom ATP jest dziedziczny (9). Zarówno pacjent jak i większość spokrewnionych z nim członków rodziny dotkniętych tą wadą byli pod względem klinicznym i hematologicznym bez zmian. Brak nieprawidłowości hematologicznych u pacjenta jest prawdopodobnie spowodowany wysokim poziomem ATP w erytrocytach. Krew przechowywano 6 tygodni w płynie konserwującym (kwas cytrynowy, cytrynian, glukoza) i stwierdzono, że 74% znakowanych ^{51}Cr autotransfuzjowanych erytrocytów przeżyło 24 godziny w przeciwieństwie do 28% przeżycia w grupie kontrolnej. Prawidłowe wartości ATP u grupy kontrolnej wynosiły: u mężczyzn $1,036 \pm 0,138$, a u kobiet $1,072 \pm 0,185 \mu\text{M}$ ATP/ml erytrocytów; osoby, u których stwierdzono wartości ATP wyższe, uważano za dotknięte wadą. Przebadano 19 osób z rodziny i u ośmiu stwierdzono od 1,323 do 2,006 μM ATP/ml erytrocytów. Deficyt dehydrogenazy glukozo-6-P wykazano tylko u pacjenta i u jego syna, który miał jednak prawidłowy poziom ATP — 1,214 μM /ml erytrocytów. Analiza stopnia pokrewieństwa osób z wysokim poziomem ATP wskazuje na autosomalny sposób dziedziczenia tej wady, przy czym wszyscy dotknięci nią osobnicy są przypuszczalnie heterozygotami względem tego genu, byłaby to więc cecha dominująca. Geny sierpowatości i niedoboru dehydrogenazy glukozo-6-P dziedziczą się niezależnie od cechy podwyższonego poziomu ATP. Przyczyna wysokiego poziomu ATP w opisanej rodzinie jest nieznana. Aktywność kinazy pirogronianowej w erytrocytach była w normie.

Zurcher i wsp. (57) badając rodziny holenderskie z różnymi rodzajami anemii, często stwierdzali obniżoną zawartość ATP w erytrocytach u pacjentów z heterozygotyczną β -talasemią. W jednej z rodzin udało się autorom rozróżnić cztery grupy pacjentów (tablica 1).

Tablica 1

Zależność między poziomem ATP w erytrocytach a występowaniem β -talasemii u rodziny holenderskiej według (57)

Grupa	Ilość osób	Talasemia	Poziom ATP*
I	18	—	2,0—2,2
II	29	—	1,0—1,2
III	14	+	0,8—1,0
IV	nie podano	+	1,9—2,0

* w μM /ml erytrocytów

Opisany wysoki poziom ATP jest prawdopodobnie dominującą autosomalną dziedziczną nienormalnością erytrocytów. Geny talasemii dziedziczą się niezależnie od cechy podwyższonego ATP.

Jedyną anormalnością enzymatyczną we krwi osób z wysokim poziomem ATP była bardzo wysoka aktywność kinazy pirogronianowej w erytrocytach. Erytrocyty te wykazywały prawidłowy czas przeżycia, zwiększony poziom Hb i prawidłową produkcję mleczanu podczas inkubacji z glukozą. Nie stwierdzono braku ATP-azy. We frakcji kwasorozpuszczalnej erytrocytów stwierdzono prawidłowy poziom AMP i ADP oraz wyraźnie obniżony poziom 2,3-dwufosfoglicerynianu (0,54—1,37 μ M/ml krwinek).

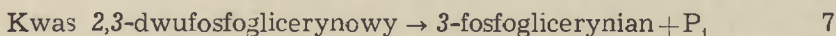
Autorzy sugerują, że pierwotnym zaburzeniem w opisywanym rodzinnym wysokim poziomie ATP jest wzrost aktywności kinazy pirogronianowej w erytrocytach, co powoduje spadek stężenia 2-fosfoenolpirogronianu, a następnie 2-fosfo- i 3-fosfoglicerynianu. Niskie stężenie tego ostatniego może wywierać potrójny wpływ:

1. Reakcja katalizowana przez kinazę fosfoglicerynianu (reakcja 6) ulegnie przesunięciu w prawą stronę.



2. Reakcja katalizowana przez dwufosfogliceromutazę (reakcja 5) będzie zachodziła ze zmniejszoną szybkością i ilość 2,3-dwufosfoglicerynianu będzie malała.

3. Reakcja katalizowana przez fosfatazę 2,3-dwufosfoglicerynianową (reakcja 7) może być przyspieszona w wyniku niskiego stężenia 3-fosfoglicerynianu.



Efektem całkowitym będzie podwyższenie zawartości ATP i spadek ilości 2,3-dwufosfoglicerynianu.

LITERATURA

1. Bartlett G. R., *J. Biol. Chem.* **234**, 449 (1959).
2. Beutler E., *J. Lab. Clin. Med.* **44**, 439 (1954).
3. Beutler E., Dern R. J., Flanagan C., Alving A. S., *J. Lab. Clin. Med.* **45**, 286 (1955).
4. Beutler E., Robson H., *J. Clin. Invest.* **36**, 617 (1957).
5. Beutler E., *Blood* **14**, 103 (1959).
6. Bowman H. S., Procopio F., *Ann. Int. Med.* **58**, 567 (1963).
7. Brewer G. J., *J. Lab. Clin. Med.* **58**, 217 (1961).
8. Brewer G. J., *J. Clin. Invest.* **43**, 1287 (1964).
9. Brewer G. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 430 (1965).
10. Carson P. E., Brewer G. J., Ickes Ch., *J. Lab. Clin. Med.* **58**, 804 (1961).
11. Dacie J. V., *Quart. J. Med.* **22**, 79 (1954).
12. Dern R. J., *J. Lab. Clin. Med.* **43**, 303 (1954).
13. Dern R. J., *J. Lab. Clin. Med.* **44**, 171 (1954).
14. Fegler G., *Nature* **170**, 624 (1952).
15. Gibson Q., *Biochem. J.* **42**, 13 (1948).

16. Greger J., Praca doktorska, Akademia Medyczna, Łódź (1966).
17. deGruchy G. C., Santamaria J. N., Parsons I. C., *Blood* **16**, 1371 (1960).
18. Horlein H., Weber G., *Dtsch. Med. Wschr.* **73**, 476 (1948).
19. Huennekens F. M., Lin L., Mywrs H. A., *J. Biol. Chem.* **227**, 253 (1957).
20. Huennekens F. M., Caffray R. W., Basford R. E., *J. Biol. Chem.* **227**, 261 (1957).
21. Jabłońska-Skwiecińska E., Królikowska I., *Pol. Arch. Med. Wewn.* **35**, 863 (1965).
22. Jabłońska-Skwiecińska E., *Pol. Arch. Med. Wewn.* **35**, 1571 (1965).
23. Jandl J. H., *J. Clin. Invest.* **39**, 1818 (1960).
24. Kellermeyer R. W., *J. Lab. Clin. Med.* **52**, 827 (1958).
25. Kellermeyer R. W., Carson P. E., Schrier S. L., *J. Lab. Clin. Med.* **58**, 715 (1961).
26. Kidson A., *J. Biol. Chem.* **182**, 779 (1950).
27. Leyko W., Związki adeninowe krwi ludzkiej, Łódzkie Towarzystwo Naukowe (1959).
28. Leyko W., *Post. Biochem.* **12**, 225 (1966).
29. Maj S., *Pol. Tyg. Lek.* **17**, 921 (1962).
30. Maj S., *Pol. Arch. Med. Wewn.* **35**, 1709 (1965).
31. Maj S., Pawelski S., Jabłońska E., *Pol. Arch. Med. Wewn.* **34**, 93 (1964).
32. Marks P. A., Gross R. T., *J. Clin. Invest.* **38**, 2253 (1959).
33. Marth H. R., *Schweiz. Med. Wchnsr.* **92**, 1430 (1962).
34. Mills D. C. B., *Biochem. J.* **98**, 32 (1966).
35. Mohler D. N., Groskett Ch. J., *Blood* **23**, 427 (1964).
36. Morrison D. B., *Science* **87**, 15 (1938).
37. Motulsky A. S., *Human Biol.* **32**, 28 (1960).
38. Murawski K., Szymanowska Z., Kozłowska J., *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 442 (1963).
39. Murawski K., *Pol. Tyg. Lek.* **36**, 1355 (1964).
40. Muller J., Murawski K., Szymanowska Z., *Acta Med. Scand.* **173**, 243 (1963).
41. Neiman N., Dreyfus J. C., Pierson M., *Blood* **23**, 848 (1964).
42. Oski F. A., Diamond L. K., *Blood* **23**, 550 (1964).
43. Rapoport S., Leubering J., *J. Biol. Chem.* **196**, 583 (1952).
44. Rapoport S., Medizinische Biochemie, Veb. Verlag Volk Gesundheit, Berlin (1964) str. 595 i nast.
45. Robinson M. A., Loder P., de Gruchy G. C., *Brit. J. Haemat.* **7**, 327, (1961).
46. Schrier S. L., Kellermeyer R. W., Carson P. E., *J. Lab. Clin. Med.* **52**, 109 (1958).
47. Scott E. M., Hoskins D. D., *Blood* **13**, 795 (1958).
48. Scott E. M., Griffith I. V., *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 384 (1959).
49. Szczeklik E., Enzymologia kliniczna, PZWL (1964).
50. Szeinberg A., *Blood* **13**, 1043 (1958).
51. Szeinberg A., Marks D. A., *J. Clin. Invest.* **40**, 914 (1961).
52. Szeinberg A., Clejan L., *Biochim. Biophys. Acta* **93**, 564 (1964).
53. Tanaka K. K., Valentine W. N., Miwa S., *Blood* **19**, 267 (1962).
54. Townes P. L., Lovell G. R., *Blood* **18**, 18 (1961).
55. Townes P. L., Morrison M., *Blood* **19**, 60 (1962).
56. Vullo C., Ponizon F., *Acta Haematol.* **22**, 146 (1959).
57. Zurcher C., Loos J. A., Prins H. K., *Folia Haematol.* **83**, 366 (1965).

ALINA JOANNA HLYŃCZAK*, JOZEF SYSA**

Methemoglobina i jej redukcja w krwinkach czerwonych

Methaemoglobin and its Reduction in the Red Blood Cells

Hypotheses on the reduction of methaemoglobin to haemoglobin in the red blood cells are presented.

W warunkach fizjologicznych tylko nieznaczna część hemoglobiny krwinek czerwonych (0,7—1,7%) (30) ulega utlenianiu do methemoglobiny (MetHb), która nie ma zdolności odwracalnego wiązania tlenu. Zwiększenie zawartości MetHb w krwinkach czerwonych wywołuje stan zwany methemoglobinemią lub inaczej hemoglobinemią, zaliczaną do sinic rzekomych. Methemoglobinemię nabytą mogą powodować niektóre leki na przykład sulfonamidy, nitrogliceryna i związki chemiczne stosowane w przemyśle (anilina, nitrobenzen, azotyny i inne) (4, 18, 20, 21, 28, 29), utleniające Fe^{2+} do Fe^{3+} .

Poza tym znane są również rzadkie postacie methemoglobinemii wrodzonej występującej wskutek odziedziczenia bądź wady układu enzymatycznego krwinki, bądź nieprawidłowej hemoglobiny Hb M (3, 5, 9, 13, 14, 15, 34). Pierwsza z nich charakteryzuje się zmniejszeniem szybkości redukcji methemoglobiny wskutek niedoboru NAD (14, 15) przy prawidłowej szybkości jej powstawania. W drugiej postaci hemoglobina typu Hb M przechodzi pod wpływem tlenu dwukrotnie szybciej w MetHb niż prawidłowa hemoglobina (13, 34). Mamy tu więc do czynienia z nadmiernym wytwarzaniem methemoglobiny przy zachowaniu prawidłowej szybkości redukcji.

Zaobserwowano też sporadyczne przypadki methemoglobinemii napaadowej (5). Przemijające zwiększenie methemoglobiny stwierdza się we krwi u kobiet w czasie miesiączki.

W methemoglobinemii dziedzicznej wynaczyniona krew ma odcień brunatnawy, który nie znika nawet po 24 godzinach, podczas gdy w methemoglobinemii toksycznej zmienia ona barwę z brunatnej na szkarłatną już po kilku godzinach wskutek rozpadu MetHb (7).

W methemoglobinemii znacznego stopnia, gdy stężenie MetHb we krwi przekracza 40, a nawet 50%, upośledzone jest przenoszenie i odda-

* Dr, adiunkt Katedry Fizjologii Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi.

** Doc. dr med., szef Katedry Fizjologii Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi.

Kiese (26) wyodrębnił z krwinek czerwonych konia enzym, który katalizował redukcję MetHb przez zred. NADP i w mniejszym stopniu także przez zred. NAD, przy czym dodanie błękitu metylenowego zwiększało szybkość redukcji. Podobną reduktazę wyodrębniono z krwinek czerwonych ludzkich; do jej działania niezbędna była obecność błękitu metylenowego lub jonów żelaza trójwartościowego, co nasuwało myśl, że fizjologiczny kofaktor został utracony podczas oczyszczania (17, 22, 23, 24).

Zależność redukcji MetHb od przemiany węglowodanowej w krwinkach czerwonych przedstawiono na schemacie 1 (6, 8).

II. Utlenianie hemoglobiny i redukcja methemoglobiny przez błękit metylenowy

Błękit metylenowy może zarówno utleniać Fe^{2+} hemoglobiny powodując jej przekształcenie w methemoglobinę, jak też redukować Fe^{3+} methemoglobiny zamieniając ją na hemoglobinę.

Wprowadzenie dożylnie błękitu metylenowego zdrowym zwierzętom powoduje powstawanie methemoglobiny. Natomiast błękit metylenowy wstrzyknięty dożylnie zwierzętom, u których uprzednio wywołano methemoglobinemię, przyspiesza redukcję methemoglobiny. W doświadczeniach *in vitro* dodanie do środowiska 56 mM glukozy i 0,13 mM błękitu metylenowego obniża stężenie MetHb z 84% do 28%. Natomiast dodatek 110 mM DL-mleczanu i 0,13 mM błękitu metylenowego obniża stężenie methemoglobiny tylko do 48% (16).

W zhemolizowanych krwinkach czerwonych dodatek błękitu metylenowego powoduje jedynie utlenianie hemoglobiny. Redukcja methemoglobiny w tych warunkach nie zachodzi, gdyż w hemolizatach brak jest nukleotydów pirydynowych. Wiadomo, że nukleotydy te znikają szybko po lizie krwinek czerwonych i homogenizacji niektórych tkanek zwierzęcych (40). Dodając amidu kwasu nikotynowego można zapobiec hydrolizie nukleotydu pirydynowego podczas procesu rozpadania się struktury komórkowej. Uważa się, że amid kwasu nikotynowego w wysokim stężeniu jest specyficznym, kompetytywnym inhibitorem nukleozydazy, która uwalnia amid kwasu nikotynowego z NAD podczas dezintegracji tkanek zwierzęcych. Po dodaniu amidu kwasu nikotynowego do hemolizatów obserwowano redukcję methemoglobiny, którą można było zahamować przez dodanie niskich stężeń jodooctanu, znanego inhibitora dehydrogenaz współdziałających z NAD.

Zaobserwowano przyspieszenie redukcji MetHb w krwinkach czerwonych preinkubowanych z azotynem, które mieszało z krwinkami niezmienionymi, co wskazywałoby na zależności metaboliczne między poszczególnymi krwinkami czerwonymi (25). Możliwe, że mleczan produ-

kowany przez niezmienione komórki służy jako substrat dla przemiany w komórkach zawierających MetHb. Być może istnieją też bezpośrednie oddziaływania na przykład przez aktywne grupy w błonie komórkowej. Wpływ na redukcję MetHb w krwinkach wywierają nie tylko niezmienione erytrocyty, ale także komórki innych narządów (12). Wprowadzenie krwinek czerwonych zawierających methemoglobinę do łożyska żyły wrotnej szczura przyspiesza redukcję MetHb. Zjawisko to jest szczególnie wyraźne w obecności błękitu metylenowego, przy czym przyspieszenie zależy od stężenia tego barwnika. Wyłączenie wątroby z tego układu zmniejsza szybkość redukcji, a przy dużych stężeniach barwnika dochodzi nawet do wzrostu ilości MetHb na skutek autooksydacji spowodowanej przez błękit metylenowy. Badania te przeprowadzono na krwinkach czerwonych człowieka i królika. W krwinkach czerwonych świni, które odznaczają się mniejszą aktywnością przemiany MetHb i brakiem redukcji MetHb uzależnionej od zredu. NADP wykazano przyspieszający wpływ wątroby na redukcję MetHb w obecności błękitu metylenowego. Natomiast w obecności błękitu toluidynowego użytego w tym samym stężeniu występuje w erytrocytach świni utlenianie barwnika krwi, podczas gdy u innych gatunków zwierząt błękit toluidynowy działa tak samo jak błękit metylenowy. W doświadczeniach bez udziału wątroby błękit toluidynowy tak samo jak błękit metylenowy przyspiesza redukcję methemoglobiny.

Proces przyspieszania redukcji MetHb zachodzi, być może, wskutek oddawania do środowiska perfuzyjnego substratu potrzebnego do tej redukcji, bądź wskutek aktywacji lub reaktywacji układów enzymatycznych krwinek czerwonych. Możliwe jest także bezpośrednie reduktywne działanie wątroby na krwinki poprzez aktywne grupy umiejscowione w błonie komórkowej, przy czym błękit metylenowy może służyć jako pośrednik. A zatem komórki wątroby redukowałyby błękit metylenowy czy inny barwnik, który po adsorpcji przez powierzchnię erytrocytu redukowałby z kolei MetHb (2).

III. Rola glutationu w redukcji methemoglobiny

Niedobór glutationu w świeżych krwinkach czerwonych lub w krwinkach poddanych działaniu związków chemicznych zawsze znajduje wyraz w skróceniu okresu przeżywania krwinek czerwonych i na ogół łączy się z nagromadzeniem produktów utleniania hemoglobiny (między innymi MetHb) (19). Zmniejszona ilość glutationu w postaci zredukowanej w krwinkach czerwonych może być związana między innymi z niedoborem zredu. NADP wywołanym przez niedobór dehydrogenazy glukozo-6-fosforanu. Redukcja utlenionej formy glutationu zachodzi prawidłowo

gdy obecne są dwa związane ze sobą czynnościowo enzymy: dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu, dostarczająca zredu. NADP oraz reduktaza glutationu zużywająca zredu. NADP. Przyczyną niedoboru GSH może być zahamowanie jednej z tych reakcji lub też prawie całkowity brak GSH na powierzchni krwinki. Ten defekt enzymatyczny może występować w pewnych przypadkach wrodzonej methemoglobinemii i w chorobach hemolitycznych, uzależnionych od nieprawidłowej zawartości glutationu (8, 19, 36).

Mills i Randal (31, 32, 33) badając krew szczurzą doszli do wniosku, że GSH ochrania Hb od szkodliwych czynników utleniających tylko w obecności dodatkowego enzymu, który nazwali peroksydazą glutationową. Wyniki badań przeprowadzonych na erytrocytach ludzkich sugerują natomiast, że sam GSH chroni hemoglobinę od utleniania i niepotrzebne są dodatkowe czynniki. Przeważa pogląd, że *in vivo* GSH może ochraniać hemoglobinę od utleniających czynników, jednak ochrona ta jest zależna od niehemoglobinowego białka erytrocytów; być może wspomnianej wyżej glutationowej peroksydazy (19).

Po dodaniu GSH zarówno do hemolizatów jak i do krwinek nieuszkodzonych zawierających MetHb zachodzi jej redukcja (37). Wykazano, że GSH redukuje MetHb bezpośrednio i że utworzony GSSG może być redukowany w obecności zredu. NADP przez reduktazę glutationu, przy czym mechanizm redukcji GSSG przebiega tylko w nieuszkodzonych krwinkach czerwonych. Ta część redukcji, zależna od cyklu pentozowego (38), jest zapoczątkowana przez spontaniczną reakcję między GSH a MetHb (schemat 2).



Schemat 2. Redukcja methemoglobiny

Oprócz GSSG ludzkie krwinki czerwone mogą redukować także inne dwusiarczki, przy czym redukcja większości z nich odbywa się prawdopodobnie przez spontaniczną reakcję z wewnątrzkomórkowym glutationem (11). W nieuszkodzonej ludzkiej krwi czerwonej powstają wtedy odpowiednie pochodne tiolowe pod warunkiem, że w badanym środowisku jest obecna glukoza lub adenozyne (10).

IV. Rola kwasu askorbinowego w redukcji methemoglobiny

Badania nad działaniem kwasu askorbinowego na redukcję MetHb w nieuszkodzonych erytrocytach oprócz znaczenia teoretycznego mają także duże znaczenie praktyczne (27). Kwas askorbinowy, jak już wspomniano, jest stosowany jako środek leczniczy w methemoglobinemii. Podaje się go zasadniczo we wszystkich przypadkach, w których nie ma konieczności usunięcia stanu zagrażającego życiu przez szybkie obniżenie poziomu MetHb. Dotyczy to w pierwszym rzędzie wrodzonej methemoglobinemii enzymopenicznej, w której zawartość MetHb we krwi daje się wyraźnie obniżyć przez długotrwałe leczenie kwasem askorbinowym (15, 39). Natomiast w ostrej toksycznej methemoglobinemii stosuje się barwniki redukująco-utleniające, działające znacznie szybciej. Ażeby osiągnąć bowiem taką samą szybkość redukcji methemoglobiny, jaką uzyskuje się po podaniu błękitu metylenowego w ilości 10^{-4}M na litr krwi należy podać aż 0,2—0,3M kwasu askorbinowego na 1 litr krwi. Jest to związane z jakościowo różnym przebiegiem redukcji MetHb w erytrocytach pod wpływem tych związków.

Prawidłowe krzywe dysocjacji tlenu po podaniu błękitu metylenowego wskazują, że barwnik ten wpływa na redukcję MetHb na drodze katalitycznej, natomiast przebieg tych krzywych po podaniu kwasu askorbinowego świadczy, że redukuje on MetHb nieenzymatycznie.

Kwas askorbinowy redukuje MetHb w nieuszkodzonych erytrocytach i hemolizatach prawdopodobnie reagując z nią bezpośrednio, a ponadto w hemolizatach może znacznie opóźniać utlenianie Hb przez NaNO_2 . Duże stężenia kwasu askorbinowego powodują redukcję barwnika we wszystkich krwinkach czerwonych zawierających methemoglobinę, natomiast przy niskich stężeniach kwasu askorbinowego redukcja MetHb przebiega nierównomiernie, co jest związane z właściwościami poszczególnych erytrocytów.

V. Rola adrenaliny w redukcji methemoglobiny

Adrenalina może katalitycznie przyspieszać redukcję MetHb (2), przy czym z jednej strony wiadomo, że adrenalina utlenia się względnie łatwo na produkty o właściwościach *redox* (na przykład adrenochrom), z drugiej strony zaś jest rzeczą znaną, że w zawiesinie erytrocytów może być ona stabilizowana na dłuższy przeciąg czasu. Przyspieszenie redukcji MetHb przez adrenalinę w obecności glukozy jest minimalne w erytrocytach królika i świnki morskiej, natomiast — znaczne w krwinkach czerwonych świni i konia cechujących się powolną przemianą materii (1). W obecności mleczanu adrenalina silnie przyspiesza przekształcenie MetHb w Hb w erytrocytach królika.

Zwiększenie redukcji MetHb przez adrenalinę jest zależne w pewnych granicach od stężenia adrenaliny. Pod wpływem dużych stężeń, po początkowym silnym przyspieszeniu redukcji, dochodzi ponownie do tworzenia się methemoglobiny. Można by to tłumaczyć tym, że adrenalina zostaje utleniana przez MetHb do związku wykazującego właściwości utleniająco-redukujące. Nie wiadomo jednak czy jest to adrenochrom, czy inny produkt. Fakt, że w obecności mleczanu adrenalina wykazuje także działanie katalityczne i że w hemolizacie zawierającym MetHb nie można wykazać wyraźnego wpływu adrenaliny na MetHb po dodaniu NADP, pozwala przypuszczać, że redukcja produktu utleniania adrenaliny przebiega przez układy redukujące erytrocytów uzależnione od NAD. Nie można jednak przypisywać adrenalinie szczególnego znaczenia w fizjologicznej redukcji MetHb w krwińce czerwonej *in vivo*, bowiem jej skuteczne stężenia są bardzo wysokie, a więc нефizjologiczne. Być może, ma tu pewne znaczenie zdolność magazynowania adrenaliny w niektórych tkankach ustroju.

Podsumowując należy podkreślić, że zasadniczym czynnikiem ochraniającym żelazo w hemoglobinie przed utlenieniem są zredukowane nukleotydy pirydynowe, których redukcja może przebiegać różnymi drogami.

LITERATURA

1. Banaschak H., *Folia Haematol.* **83**, 277 (1965).
2. Banaschak H., Schäfer R., *Arch. Int. Pharmacodyn.* **129**, 330 (1960).
3. Bancroft H., Gibson Q. H., Harrison D. C., Mc Murray, *Clin. Sci.* **5**, 145 (1945).
4. Bénard H., Bajdos A., Tissier M., *Hémoglobine et pigments apparentés*, wyd. Masson et Cie Paryż 1949.
5. Bielewicz J., *Pol. Tyg. Lek.* **14**, 320 (1959).
6. Bogusławska-Jaworska J., Kwiatkowska J., *Post. Hig. i Med. Dośw.* **20**, 31 (1966).
7. Brandenburg R. O., Smith H. L., *Am. Heart. J.* **42**, 582 (1951).
8. Brewer G. J., Tarlow A. R., Alwing A. S., *Bull. Wld. Hlth. Org.* **22**, 633 (1960).
9. Cox W. W., Wendel W. B., *J. Biol. Chem.* **143**, 331 (1942).
10. Eldjarn L., Bremer J., *Biochem. J.* **84**, 286 (1962).
11. Eldjarn L., Bremer J., Börresen H. C., *Biochem. J.* **82**, 192 (1962).
12. Faulhaber H. D., Spinner H., *Folia Haematol.* **83**, 271 (1965).
13. Gerald P. S., *Blood* **13**, 936 (1958).
14. Gibson Q. H., *Biochim. J.* **42**, 13 (1948).
15. Gibson Q. H., Harrison D. C., *Lancet* **253**, 941 (1947).
16. Gutmann H. R., Jandorf B. J., Bodansky O., *J. Biol. Chem.* **169**, 145 (1947).
17. Harrop G. A., Barron E. S. G., *J. Exptl Med.* **48**, 207 (1928).
18. Hesse E., *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* **124**, 209 (1927).

19. Hill A. S., Haut A., Cartwright G. E., Wintrobe M. M., *J. Clin. Invest.* **43**, 17 (1964).
20. Hłyńczak A. J., Leyko W., *Biul. WAM* **8**, 109 (1965).
21. Hłyńczak A. J., Leyko W., *Biul. WAM* **8**, 215 (1965).
22. Huennekens F. M., Caffrey R. W., Basford R. E., Gabrio B. W., *J. Biol. Chem.* **227**, 261 (1957).
23. Huennekens F. M., Caffrey R. W., Gabrio B. W., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **75**, 167 (1958).
24. Jaffé F. R., *J. Clin. Invest.* **38**, 1555 (1959).
25. Jung F., Matthies H., Onnen K., *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* **222**, 474 (1954).
26. Kiese M., *Biochem. Z.* **316**, 264 (1944).
27. Kleihauer E., *Folia Haematol.* **83**, 283 (1965).
28. Leyko W., Związki adeninowe krwi ludzkiej, Ł. T. N., III, 61, Łódź 1959.
29. Leyko W., Dmochowski A., Bolanowska W., Lorenc J., II Krajowe Sympozjum na temat „Biochemia krwi czerwonej” 1962.
30. Ławkowicz W., Krzemińska-Ławkowiczowa I., Diagnostyka hematologiczna, PZWL, Warszawa 1960.
31. Mills G. C., *J. Biol. Chem.* **229**, 189 (1957).
32. Mills G. C., *J. Biol. Chem.* **234**, 502 (1959).
33. Mills G. C., Randall H. P., *J. Biol. Chem.* **232**, 589 (1958).
34. Mleczek K., Ruszkowski M., Trief H., *Biul. WAM* **7**, 153 (1964).
35. Spicer S. S., Hanna C. H., Clark A. M., *J. Biol. Chem.* **177**, 217 (1949).
36. Storti E., Leoncini G., Traldi A., Fornaini G., *Acta Haematol.* **35**, 284 (1966).
37. Strömme J. H., Eldjarn L., *Biochem. J.* **84**, 406 (1962).
38. Szeinberg A., Marks P. A., *J. Clin. Invest.* **40**, 914 (1961).
39. Waisman H., Bain J., Richmond J., Munsey F., *J. Lab. Clin. Med.* **10**, 293 (1952).
40. Warburg O., Kubowitz F., Christian W., *Biochem. Z.* **227**, 245 (1930).
41. Wendel W. B., *Proc. Soc. Exptl Biol. N.Y.* **28**, 401 (1930).

MARIA GABRIELA SARZAŁA*

Trawienie i wchłanianie trójglicerydów

Digestion and Absorption of Triglycerides

The present state of knowledge concerning digestion and absorption of triglycerides is reviewed.

Jednym z zasadniczych zagadnień związanych z trawieniem i wchłanianiem tłuszczów jest przenikanie do komórek śluzówki jelita tych nierozpuszczalnych w wodzie substancji dających w wyniku hydrolizy również nierozpuszczalne produkty (kwasy tłuszczowe, monoglicerydy). W XIX wieku rozpowszechniony był pogląd, że tłuszcze wchłaniane są w postaci niezmienionej, na zasadzie jakby „wsiąkania” w ścianę jelita (29, 50, 61).

Obserwacje nad hydrolizą tłuszczów w przewodzie pokarmowym, udziałem żółci i soku trzustkowego oraz nad działaniem lipazy stały się podstawą nowej teorii wchłaniania tłuszczów nazwanej później „lipolityczną” a sformułowanej w 1900 roku przez Pflügera (56). Według niej wchłanianiu do komórek nabłonka śluzówki jelita ulegają produkty całkowitej hydrolizy trójglicerydów — glicerol bezpośrednio, a kwasy tłuszczowe po uprzednim ich zmydleniu węglanem sodu.

Teorię Pflügera zmodyfikował dopiero w latach trzydziestych Verzar (75), który również uważał, że tłuszcz w świetle jelita ulega całkowitej hydrolizie, przy czym zemulgowanie lipidów ułatwia ich kontakt z lipazą, przeczył jednak możliwości tworzenia się mydeł ze względu na zbyt niskie pH w jelicie. Według Verzara uwolnione kwasy tłuszczowe tworzą z solami kwasów żółciowych kompleksy dyfundujące przez błonę komórkową i ulegające przy tym rozbićiu. Po przedostaniu się do komórek nabłonka glicerolu i kwasów tłuszczowych powstają z nich ponownie trójglicerydy, natomiast sole kwasów żółciowych powracają do światła jelita i mogą znowu brać udział w wiązaniu kwasów tłuszczowych.

Natomiast według tak zwanej „teorii partycyjnej” wysuniętej w latach czterdziestych przez Frazera (25) hydroliza lipidów w jelicie nie

* Dr, adiunkt Zakładu Biochemii Instytutu Biologii Doświadczanej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie.

jest całkowita między innymi dlatego, że gromadzące się na powierzchni cząstek emulsji wolne kwasy tłuszczowe uniemożliwiają lipazie kontakt z trójglicerydami na granicy faz lipidy—woda. Część trójglicerydów pozostaje niezhydrolizowana, a uwalnia się tylko około 30% kwasów tłuszczowych, przy czym powstają głównie dwu- i monoglicerydy. Pod wpływem trójskładnikowego układu: kwas tłuszczowy — monoglicerydy — sole kwasów żółciowych powstaje lipidowa emulsja, której cząstki o średnicy około $0,5 \mu$ mogą przenikać przez błonę.

Teoria partycyjna zakłada dwie różne drogi wchłaniania lipidów. Zemulgowane trójglicerydy wnikają do komórek nabłonka, skąd poprzez układ limfatyczny przechodzą do krwi, natomiast uwolnione kwasy tłuszczowe dostają się bezpośrednio do żyły wrotnej, a następnie do wątroby, gdzie ulegają utlenieniu.

Teoria ta, bardzo kontrowersyjna i pozostawiająca wiele kwestii niewyjaśnionych, zapoczątkowała bardzo intensywny okres badań biochemicznych i histologicznych, zmierzających głównie w trzech kierunkach, które będą kolejno omówione.

I. Procesy zachodzące w świetle jelita w czasie trawienia i wchłaniania lipidów

Podobnie jak Frazer również Desnuelle i wsp. (20, 21), Borgström (8—13) i Favarger i wsp. (22) stwierdzili, że hydroliza lipidów w świetle jelita nie jest kompletna. Okazało się przy tym, że dokładne oznaczenie ilości poszczególnych frakcji powstających w wyniku hydrolizy jest niemożliwe, ponieważ jednocześnie z hydrolizą zachodzi pod wpływem lipazy transestryfikacja prowadząca do częściowej resyntezy trójglicerydów z monoglicerydów i dwuglicerydów (12). Schönheyder i Volqvartz (63) wykazali *in vitro*, że pod wpływem lipazy z tłuszczów powstają kolejno dwuglicerydy, monoglicerydy i glicerol. Lipaza trzustkowa hydrolizuje wiązanie estrowe trójglicerydów głównie w pozycji 1 i 3-glicerolu (9, 20, 48, 49), skutkiem czego w jelicie w czasie trawienia lipidów gromadzą się duże ilości 2-monoglicerydów (33, 49).

Hofmann i Borgström (32) wirując treść jelitową pobraną w czasie trawienia lipidów rozdzielili ją na dwie fazy, górną — oleistą i dolną, przezroczystą — wodną. Obydwie fazy zawierały mniej więcej jednakowe ilości lipidów, ale ich skład był różny: faza oleista zawierała przede wszystkim dwu- i trójglicerydy oraz niewielkie ilości kwasów tłuszczowych i monoglicerydów, faza wodna natomiast zawierała wolne kwasy tłuszczowe i monoglicerydy oraz bardzo nieznaczne ilości dwu- i trójglicerydów. Występowanie tych związków w fazie wodnej Hofmann i Borgström tłumaczą tworzeniem się uporządkowanych zespołów cząstek rozpuszczalnych w wodzie tzw. micelli. Sole kwasów żółciowych

jako związki amfipatyczne mogą w świetle jelita tworzyć agregaty, w których części polarne cząsteczek skierowane są na zewnątrz (w stronę środowiska wodnego), a hydrofobowe części niepolarne połączone siłami van der Waalsa — do wewnątrz. Takie agregaty mają zdolność włączania w swój skład związków lipidowych o charakterze polarnym, kwasów tłuszczowych i monoglicerydów, co prowadzi do powstania rozpuszczalnych micelli. Te micelle „mieszane” odznaczają się pewną zdolnością solubilizacji lipidów niepolarnych, jednak tak niewielką, że trójglicerydy i dwuglicerydy występują w świetle jelita głównie w formie emulsji stabilizowanej przez sole kwasów żółciowych, gromadzących się na granicy faz.

Ze względu na niewielkie rozmiary (30—200 Å) i wysoki stopień uporządkowania micelli, roztwór taki jest optycznie pusty, można zatem mówić o występowaniu monoglicerydów i wolnych kwasów tłuszczowych w formie rozpuszczalnej. Monoglicerydy występują w układzie micellarnym w formie niezjonizowanej. Ich solubilizacja nie zależy od pH środowiska (31), a jest uwarunkowana prawdopodobnie tworzeniem się bliżej nieznanego połączenia z solami kwasów żółciowych. Natomiast solubilizacja kwasów tłuszczowych zależy od pH i temperatury; zjonizowane kwasy są lepiej solubilizowane. Przy pH panującym w świetle jelita około połowa kwasów tłuszczowych tworzących micelle występuje w formie zjonizowanej.

Dotychczas nie wiadomo, jaki jest kształt micelli i molekularne rozmieszczenie poszczególnych jej składników, a także stopień ich wymiany z cząsteczkami występującymi w fazie niemicellarnej.

II. Przenikanie lipidów przez błonę komórkową

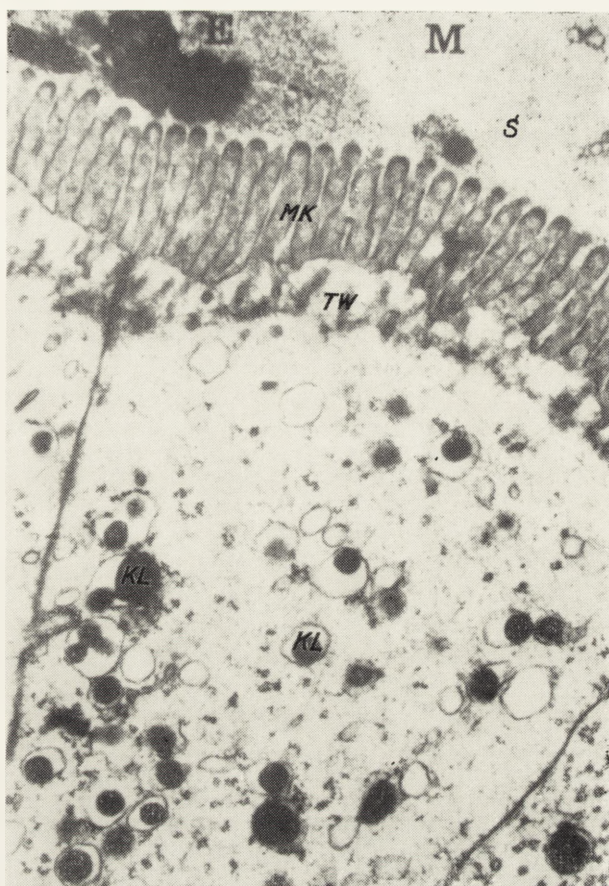
Zastosowanie mikroskopu elektronowego do badań morfologicznych, umożliwiające dokładniejsze poznanie struktury komórek śluzówki jelita dostarczyło wielu nowych danych o przenikaniu lipidów przez błony komórkowe, jednak nie pozwoliło na całkowite zrozumienie mechanizmu wchłaniania lipidów. Z obrazów otrzymanych w mikroskopie elektronowym wynika, że błona komórkowa komórek śluzówki, będąca barierą między środowiskiem zewnętrznym a cytoplazmą, zbudowana jest z bimolekularnej warstwy lipidów otoczonej z dwu stron przez warstewki białka (26, 27). Na skutek wytworzenia licznych wpukleń błony powstają mikrokosmki rąbka brzeżnego, co zwiększa znacznie powierzchnię chłonną jelita. Obliczono, że pojedyncza komórka absorbująca nabłonka śluzówki jelita szczura zawiera około 3 000 mikrokosmków, które od strony światła jelita osłonięte są ściśle przylegającą warstwą mukoproteidów (27).

Stosowanie mikroskopu elektronowego do badań nad wchłanianiem lipidów zapoczątkowali w roku 1955 Sjöstrand i Zetterqvist (71), a Palay i Karlin (52, 53) przeprowadzili tą techniką systematyczne obserwacje. Po podaniu szczurom oliwy zaobserwowali oni występowanie osmofilnych kropelek lipidów o średnicy od 500—1000 Å pomiędzy mikrokosmkami od strony światła jelita jak również wewnątrz cytoplazmy komórek śluzówki, gdzie kropelki lipidów tej samej wielkości otoczone były podwójnymi błonami. W częściach komórki, oddalonych od światła jelita, średnica lipidowych kropelek dochodziła do około 2 000 Å. Liczne skupienia lipidowych cząstek obserwowano również w strefie aparatu Golgiego. Kropelki lipidowe przechodziły w następnej fazie wchłaniania przez błonę podstawową, skąd dostawały się do naczyń limfatycznych. Nie zaobserwowano osmofilnych cząstek ani w samych mikrokosmkach, ani tuż pod mikrokosmkami we włókienkowatej strefie cytoplazmy (ang. *terminal web*). Natomiast u podstawy niektórych mikrokosmków widoczne były zagłębienia błony rąbka brzeżnego wpuklające się do cytoplazmy. Odrywająca się błona tworzyła następnie pęcherzyki o średnicy około 600 Å. Pod wpływem diety zawierającej oliwę ilość takich pęcherzyków pinocytarnych, w których znajdowały się osmofilne kropelki lipidowe znacznie wzrastała. Na podstawie tych obserwacji Palay i Karlin wysunęli hipotezę, że do cytoplazmy komórek nabłonka lipidy dostają się na drodze pinocytozy, co zostało potwierdzone przez niektórych innych autorów (1, 2, 23, 47, 57, 72).

Zdecydowanym przeciwnikiem poglądu o roli pinocytozy w procesie absorpcji lipidów jest Sjöstrand (70), który uważa, że błony otaczające krople lipidów, znajdujące się w cytoplazmie, nie mogą pochodzić z pęcherzyków pinocytarnych, gdyż ich grubość i budowa różni się od grubości i budowy błon rąbka brzeżnego.

Wyniki badań nad przechodzeniem lipidów przez błonę komórkową śluzówki, uzyskane w pracowni Borgströma (24, 32, 39) sugerują, że wchłanianie przez komórki kwasów tłuszczowych i monoglicerydów z micellarnego roztworu lipidów nie jest procesem enzymatycznym i przebiega bez zużycia energii, o czym świadczyłby fakt, że obniżenie temperatury do 0° nie wpływa na szybkość przenikania lipidów do skrawków jelita. Ponadto skrawki jelita z różnych części przewodu pokarmowego wchłaniają lipidy z jednakową szybkością. Borgström i wsp. przypuszczają, że przenikanie lipidów z roztworu micellarnego do komórek nabłonka zachodzi wskutek ich rozpuszczania się w fosfolipidach błon komórkowych po odszczepieniu soli kwasów żółciowych. Gdyby proces ten był enzymatyczny, to należałoby oczekiwać różnic szybkości przenikania lipidów do komórek nabłonka z różnych części jelita, ponieważ większość enzymów biorących udział w procesie wchłaniania zlokalizowana jest w początkowym i środkowym odcinku jelita cienkiego (77).

Na możliwość przechodzenia micelli lipidowych drogą dyfuzji przez



Rys. 1. Fragmenty komórek nabłonka śluzówki jelita szczura w czasie wchłaniania lipidów, według (3)

Komórka absorbująca pokryta od strony światła (ś) jelita mikrokosmkami (Mk). W cytoplazmie u podstawy mikrokosmków strefa włóknikowata (ang. *terminal web* TW). W świetle jelita widoczne krople emulsji lipidowej (E) i osmofilne cząstki o średnicy około 150 Å—micelle (M). Podobne cząstki widoczne są również pomiędzy mikrokosmkami i w podstawowej części mikrokosmków. W partiach komórki bardziej oddalonych od światła jelita widoczne osmofilne krople lipidowe (KL) o średnicy od 500—2000 Å (Powiększone $\times 20000$)

blony na całej powierzchni mikrokosmków wskazują również badania za pomocą mikroskopu elektronowego (58, 73).

Inny pogląd reprezentują Ashworth i Lawrence (3). Stwierdzili oni (rys. 1), że zarówno w sztucznych roztworach micellarnych otrzymanych z kwasu oleinowego, monooleinianu i taurocholanu sodu, jak i w treści jelitowej szczura karmionego lipidami występują cząstki osmofilne o średnicy od 30—200 Å. Takie osmofilne cząstki odpowiadające wielkością micellom zaobserwowali oni również pomiędzy mikrokosmkami komórek nabłonka; są one na ogół luźno związane z okrywającymi rąbek brzeżny filamentami mukoproteidowymi. W początkowych stadiach wchłaniania lipidów w komórkach absorbujących nabłonka jelita wytwarzały się jak gdyby „kieszenie” powstające wskutek „wpływania” błony komórkowej do apikalnej części komórki (ang. *membrane flow*). Wpływająca błona tworzyła widoczne w strefie włóknistej cytoplazmy tuż pod mikrokosmkami pęcherzyki o średnicy około 1 000 Å, w których znajdowały się drobne kropelki lipidowe. W bardziej odległych od światła jelita częściach komórki znajdowały się większe, osmofilne krople lipidowe, których średnica dochodziła do 2 000 Å (rysunek 1).

Ashworth i Lawrence przypuszczają więc, że lipidy przenikają do komórek nabłonka w postaci molekularnej i dopiero w cytoplazmie zlewają się w większe skupienia. Przenikanie to może zachodzić bądź przez przyłączanie się micellarnych lipidów do błony mikrokosmków i wytwarzania luźnego kompleksu: błona-lipidy micellarne, bądź też drogą syntezy nowych lipoproteidów błony komórkowej; błona ta „wpływając” do cytoplazmy mogłaby być przenośnikiem lipidów (3). Przechodzenie całych, niezmiennych micelli bądź to drogą pinocytozy, bądź dyfuzji powodowałoby przedostawanie się do komórek nabłonka wraz z lipidami również soli kwasów żółciowych i w konsekwencji — deficyt tych ostatnich uniemożliwiający hydrolizę i wchłanianie dalszych partii lipidów (skądinąd wiadomo, że sole kwasów żółciowych nie są wchłaniane w jelicie cienkim (46)).

Jak widać, mechanizm przedostawania się lipidów ze światła jelita do komórek nabłonka daleki jest jeszcze od wyjaśnienia. Najbardziej prawdopodobne wydają się dwie koncepcje. Jedna, reprezentowana przez Borgströma i wsp. (24, 32), tłumaczy przechodzenie molekularnych kwasów tłuszczowych i monoglicerydów z micellarnego roztworu lipidów ich rozpuszczalnością w strukturalnych fosfolipidach błon komórkowych, bez udziału procesów enzymatycznych i bez zużycia energii. Druga koncepcja, reprezentowana przez Ashwortha i Lawrence'a (3) tłumaczy ten proces wbudowywaniem się lipidów w błonę komórkową, pełniącą rolę ich przenośnika. Obydwie hipotezy zakładają, że micelle podczas przenikania przez błony muszą ulec rozbiciu dzięki odszczepieniu się soli kwasów żółciowych.

Dotychczas nie wiadomo, jakie czynniki powodują odszczepianie się soli kwasów żółciowych, jak zachowują się micelle po utracie tego ważnego składnika i czy proces rozbicia micelli zachodzi na zewnątrz, czy wewnątrz błony komórkowej.

III. Procesy zachodzące w komórkach śluzówki jelita

Stwierdzenie hydrolizy lipidów w świetle jelita nasuwa zagadnienie mechanizmu ich resyntezy w komórkach śluzówki. Sam fakt resyntezy trójglicerydów w ścianie jelita znany był od 1884 roku, kiedy Munk (50) zaobserwował podczas wchłaniania kwasów tłuszczowych pojawienie się w limfie zwiększonej ilości tłuszczów obojętnych. Proces resyntezy uważany był przez długi czas za odwrócenie enzymatycznej lipolizy. W latach trzydziestych Sinclair (66—69) i Verzar (75) wysunęli przypuszczenie, że kwasy tłuszczowe po przedostaniu się do komórek śluzówki, ulegają włączeniu w fosfolipidy zanim zostaną wbudowane w trójglicerydy. Zostało to potwierdzone przez wielu badaczy (4, 5, 6, 7, 55, 62, 78). Okazało się, że całkowita ilość fosfolipidów nie wzrasta podczas wchłaniania, a tylko zmienia się rodzaj wchodzących w ich skład kwasów tłuszczowych pod wpływem kwasów podanych w pokarmie. Wzrost zawartości fosfolipidów stwierdzono jednak u niektórych gatunków owadów (78).

Zgodnie ze schematem Kennedy'ego (42), głównym intermedia-tem w biosyntezie szeregu lipidów w komórkach wątroby jest kwas fosfatydowy, powstający w wyniku estryfikacji α -glicerofosforanu przez zaktywowane kwasy tłuszczowe. Po enzymatycznej defosforylacji kwasu fosfatydowego powstają dwuglicerydy, z których syntetyzowane są bądź trójglicerydy drogą przyłączania trzeciej cząsteczki kwasu tłuszczowego, bądź za pośrednictwem odpowiednich pochodnych nukleotydów cytydylowych — fosfolipidy (42, 44, 45, 74).

Wkrótce po ukazaniu się prac Kennedy'ego i wsp. (42, 43, 76) Johnston i Bearden (36, 37) wysunęli przypuszczenie, że podobny przebieg może mieć biosynteza lipidów obojętnych i fosfolipidów w śluzówce jelita, ponieważ w czasie inkubacji „nicowanych worków” jelita chomika zarówno piętnowane kwasy tłuszczowe, jak i piętnowany ortofosforan wbudowywały się do frakcji kwasu fosfatydowego. Clark i Hübscher (16) znaleźli w śluzówce jelita enzym defosforylujący kwas fosfatydowy do dwuglicerydu — fosfatazę kwasu fosfatydowego (fosfohydrolaza kwasu L- α -fosfatydowego (3.1.3.4)), a ponadto stwierdzili estryfikowanie powstałego dwuglicerydu do trójglicerydu. Dodanie α -glicerofosforanu do mieszaniny inkubacyjnej zawierającej frakcję mitochondrialną śluzówki jelita królika, kwas tłuszczowy, ATP i CoA znacznie wzmacniało syntezę glicerydów (18). Początkowo uważano, że

w syntezie lipidów w śluzówce jelita bierze udział jedynie α -glicerofosforan pochodzący z przemiany węglowodanów, natomiast glicerol uwalniany w czasie hydrolizy trójglicerydów w świetle jelita nie jest wykorzystany z powodu braku kinazy glicerolowej (28). W ostatnich latach stwierdzono jednak wbudowywanie znakowanego glicerolu do trójglicerydów stymulowane przez wolne kwasy tłuszczowe (15, 60), a także obecność kinazy glicerolowej w śluzówce jelita szczura i innych zwierząt (19). Obecnie uważa się zatem, że wolny glicerol może ulegać w komórkach śluzówki fosforylacji i być w pewnym stopniu wykorzystany do biosyntezy trójglicerydów.

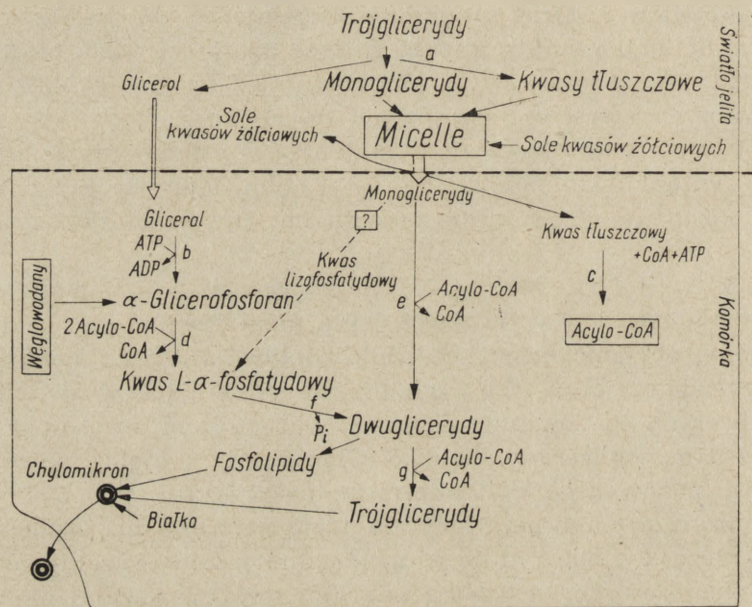
W śluzówce jelita zachodzi synteza zarówno tłuszczów obojętnych jak i fosfolipidów i szereg czynników decyduje prawdopodobnie o tym, jaki rodzaj lipidu powstaje z wspólnego prekursora — kwasu fosfatydowego (42). Hipoteza Johnstona (35) uzależnia kierunek syntezy od dopływu wolnych kwasów tłuszczowych do komórek śluzówki. Gdy dopływ jest mały, a w cytoplazmie znajdują się nukleotydy cytydylowe, zachodzi synteza fosfolipidów. Przy znacznym dopływie kwasów tłuszczowych następuje przesunięcie procesu na korzyść biosyntezy trójglicerydów.

Clark i Hübscher (17, 18) przypuszczali natomiast, że biosynteza trójglicerydów w śluzówce jelita może również zachodzić przez bezpośrednią acylację monoglicerydów dopływających do komórek śluzówki ze światła jelita. Wykazali oni, że powstające w świetle jelita 2-monoglicerydy są znacznie lepszymi akceptorami kwasów tłuszczowych niż 1-monoglicerydy. Szybkość biosyntezy trójglicerydów zależy od rodzaju podawanego monoglicerydu; na przykład monooleinian jest znacznie szybciej inkorporowany do trójglicerydów niż monopalmitynian. Syntezę trójglicerydów z monopalmitynianu i zaktywowanych kwasów tłuszczowych we frakcji mikrosomowej śluzówki jelita szczura wykazali Senior i Isselbacher (65), przy czym monoglicerydy były znacznie lepszymi akceptorami kwasów tłuszczowych, niż α -glicerofosforan. Autorzy podkreślają, że taka synteza trójglicerydów może być bardziej korzystna dla organizmu, gdyż wymaga mniejszego zużycia energii niż synteza z α -glicerofosforanu. Dowodu na to, że cała cząsteczka monoglicerydów bierze udział w reakcji, a nie produkty jej rozpadu, dostarczyły doświadczenia, w których podawano zwierzętom podwójnie piętnowany monogliceryd, znaczone ^3H w glicerolu i ^{14}C w resztach kwasów tłuszczowych (35, 38, 40). Okazało się wówczas, że stosunek ^3H do ^{14}C w dwu- i trójglicerydach tkanki jelitowej jest bardzo bliski stosunkowi w podawanym monoglicerydzie.

Na udział innego prekursora lipidów w śluzówce jelita wskazują Paris i Clement (54). Po inkubacji segmentów jelita szczura w obecności podwójnie piętnowanego monopalmitynianu, znaleźli oni radioaktywność głównie w wyizolowanym ze śluzówki jelita kwasie lizo-

fosfatydowym, co nasunęło przypuszczenie, że może on być intermediatem w biosyntezie trójglicerydów. Mógłby on powstawać w dwojaki sposób. Według jednej koncepcji z monoglicerydów w śluzówce jelita powstaje glicerol, który ulega fosforylacji do glicerofosforanu, a ten — acylowaniu do kwasu lizofosfatydowego. Według drugiej koncepcji, kwas lizofosfatydowy powstaje przez bezpośrednią fosforylację monoglicerydu. Po przyłączeniu do kwasu lizofosfatydowego drugiej cząsteczki kwasu tłuszczowego powstawałby kwas fosfatydowy. Wydaje się jednak, że hipoteza ta nie jest jeszcze wystarczająco udowodniona.

Omówione trzy możliwe drogi biosyntezy trójglicerydów przedstawia schemat 1.



Schemat 1. Hydroliza i biosynteza trójglicerydów w jelicie

a — hydrolaza estrów glicerolowych (3.1.1.3); b — transferaza ATP-glicerol (2.7.1.30); c — ligaza kwas tłuszczowy-CoA (6.2.1.3); d — acylotransferaza acylo-CoA:L-glicerol-3-fosforan (2.3.1.15); e — acylotransferaza acylo-CoA:monogliceryd; f — fosfohydrolaza kwasu L-α-fosfatydowego (3.1.3.4); g — acylotransferaza acylo-CoA:dwugliceryd

Brindley i Hübscher (14) wykazali w mikrosomach śluzówki jelita szczura obecność układów enzymatycznych umożliwiających biosyntezę trójglicerydów zarówno poprzez kwas fosfatydowy jak i poprzez monoglicerydy.

Istnieją jednak różnice zdań na temat stopnia wykorzystania przez organizm każdego z tych dwóch szlaków biosyntezy, szczególnie w czasie wchłaniania lipidów, kiedy do komórek śluzówki dopływa duża ilość monoglicerydów i wolnych kwasów tłuszczowych (30, 51, 64). Zagadnienie to zostało ostatnio do pewnego stopnia wyjaśnione przez Kerna i Borgströma (41). Badali oni rozmieszczenie radioaktywności we

frakcjach lipidowych po inkubacji skrawków jelita chomika w micelnym roztworze znakowanych prekursorów trójglicerydów i stwierdzili, że przy odpowiedniej ilości monoglicerydów dopływających do komórek śluzówki resynteza trójglicerydów zachodzi prawie całkowicie poprzez bezpośrednią estryfikację monoglicerydów. Jedynie przy niedostatecznej ilości monoglicerydów trójglicerydy są intensywnie syntetyzowane przy udziale kwasu fosfatydowego, przy czym kluczową rolę w tym procesie odgrywa fosfataza kwasu fosfatydowego. Enzym ten aktywowany jest *in vitro* przez wolne kwasy tłuszczowe, wzrost jego aktywności stwierdzono również w jelicie żaby w czasie wchłaniania lipidów (59). Być może, wolne kwasy tłuszczowe aktywując fosfatazę kwasu fosfatydowego zwiększają stopień wykorzystania tego szlaku przy biosyntezie lipidów w śluzówce. O drodze resyntezy trójglicerydów w śluzówce jelita decydowałyby zatem ilość i rodzaj dostępnych substratów.

Poznanie dróg resyntezy lipidów w śluzówce jelita nie wyjaśnia jeszcze wszystkich procesów zachodzących w komórce w związku z przyswajaniem tłuszczów. Należy bowiem również uwzględnić fakt, że lipidy opuszczają komórkę w postaci chylomikronów. Termin ten wprowadził Gage w 1920 roku dla cząstek pojawiających się we krwi i limfie podczas chłonięcia tłuszczów, widocznych w mikroskopie w ciemnym polu jako cząstki o średnicy od 0,5—1 μ , silnie rozpraszające światło. Chylomikrony zbudowane są z trójglicerydów, które stanowią około 90% ich masy, dwuglicerydów, cholesterolu, fosfolipidów, oraz białka występującego w ilości od 0,2—2%. Według Seniora (64) we wnętrzu chylomikronów znajdują się lipidy obojętne, otoczone warstewką lipoproteidową. Białko i fosfolipidy, które występują jedynie w niewielkich ilościach, są pomimo to istotnymi składnikami chylomikronów; świadczy o tym fakt, że podanie zwierzęciu związków hamujących syntezę białek i fosfolipidów powoduje nagromadzenie się lipidów obojętnych w komórkach śluzówki, oraz hamuje transport lipidów do krwi (34). Chylomikrony tworzą się w bazalnej części komórek śluzówki (34), skąd prawdopodobnie drogą pinocytozy (64) dostają się do przestrzeni międzykomórkowych, następnie do naczyń limfatycznych i do krwi. Miejsce i mechanizm powstawania chylomikronów, jak również sposób przedostawania się ich z komórek do przestrzeni międzykomórkowych, są jednak dotychczas mało poznane.

LITERATURA

1. Ashworth C. T., Sternbridge, K. A., Sanders E., *Am. J. Physiol.* **198**, 1326 (1960).
2. Ashworth C. T., Johnston J. M., *J. Lipid Res.* **4**, 454 (1963).
3. Ashworth C. T., Lawrence J. F., *J. Lipid Res.* **7**, 465 (1966).
4. Barnes R. H., Miller E. S., Burr G. O., *J. Biol. Chem.* **140**, 233 (1941).

5. Bergström S., Blomstrand R., Borgström B., *Biochem. J.* **58**, 600 (1954).
6. Bergström S., Borgström B., Carlsten A., Rottenberg M., *Acta Chem. Scand.* **4**, 1142 (1950).
7. Bergström S., Borgström B., Rottenberg M., *Acta Physiol. Scand.* **25**, 120 (1952).
8. Borgström B., *Acta Chem. Scand.* **5**, 643 (1951).
9. Borgström B., *Acta Physiol. Scand.* **25**, 328 (1952).
10. Borgström B., *Acta Physiol. Scand.* **25**, 291 (1952).
11. Borgström B., *Acta Physiol. Scand.* **25**, 315 (1952).
12. Borgström B., *Acta Physiol. Scand.* **25**, 140 (1952).
13. Borgström B., w *Lipid Metabolism*, red. K. Bloch, J. Wiley, New York 1960, str. 128.
14. Brindley D. N., Hübscher G., *Biochim. Biophys. Acta* **106**, 495 (1965).
15. Chou T. C., Lipmann F., *J. Biol. Chem.* **196**, 89 (1952).
16. Clark B., Hübscher G., *Nature* **185**, 35 (1960).
17. Clark B., Hübscher G., *Biochem. J.* **80**, 12P (1961).
18. Clark B., Hübscher G., *Biochim. Biophys. Acta* **46**, 479 (1961).
19. Clark B., Hübscher G., *Nature* **195**, 599 (1962).
20. Desnuelle P. A., *Adv. Enzymol.* **23**, 129 (1961).
21. Desnuelle P. A., Naudet M., Constantin M. J., *Biochim. Biophys. Acta* **5**, 561 (1951).
22. Favarger P., Collet R. A., *Helv. Physiol. Pharmac. Acta* **8**, 15 (1950).
23. Fawcett D. W., *J. Histochem. Cytochem.* **13**, 75 (1965).
24. Feldman E. B., Borgström B., *Lipids* **1**, 128 (1966).
25. Frazer A. C., *Physiol. Rev.* **26**, 103 (1946).
26. Freeman J. A., *Anat. Rec.* **154**, 129 (1966).
27. Freeman J. A., Geer J. C., *Am. J. Dig. Dis. N. Ser* **10**, 1004 (1965).
28. Gidez L. I., Karnowsky M. L., *J. Biol. Chem.* **223**, 293 (1956).
29. Gruby F., Delafond A. J. (1845), cyt. za Senior J. R. w *J. Lipid Res.* **5**, 495 (1964).
30. Gurr M. I., Pover W. F. R., Hawthorne J. N., Frazer A. C., w *Biochemical Problems of Lipids*, tom I, red. Frazer A. C., B. B. A. Library Elsevier Publ. Co. 1963, str. 236.
31. Hofmann A. F., *Gastroenterology* **50**, 56 (1966).
32. Hofmann A. F., Borgström B., *Fed. Proc.* **21**, 43 (1962).
33. Hofmann A. F., Borgström B., *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 317 (1963).
34. Isselbacher J. K., *Gastroenterology* **50**, 78 (1966).
35. Johnston J. M., *Adv. Lipid Res.* **1**, 105 (1963).
36. Johnston J. M., Bearden J. H., *Fed. Proc.* **19**, 230 (1960).
37. Johnston J. M., Bearden J. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **90**, 57 (1960).
38. Johnston J. M., Borgström B., *Acta Chem. Scand.* **17**, 905 (1963).
39. Johnston J. M., Borgström B., *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 412 (1964).
40. Johnston J. M., Brown J. L., *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 500 (1962).
41. Kern F., Borgström B., *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 523 (1965).
42. Kennedy E. P., *Fed. Proc.* **20**, 934 (1961).
43. Kennedy E. P., Weiss S. B., *J. Biol. Chem.* **222**, 193 (1956).
44. Kornberg A., Pricer W. E., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 1617 (1952).
45. Kornberg A., Pricer W. E., *Fed. Proc.* **11**, 242 (1952).
46. Lack L., Weiner I. M., *Am. J. Physiol.* **200**, 313 (1961).
47. Ladman A. J., Padykula H. A., Strauss E. W., *Am. J. Anat.* **112**, 389 (1963).
48. Mattson F. H., Beck L. W., *J. Biol. Chem.* **214**, 115 (1955).

49. Mattson F. H., Benedict J. H., Martin J. B., Beck L. W., *J. Nutr.* **48**, 335 (1952).
50. Munk I., *Arch. Path. Anat.* **122**, 302 (1890).
51. Noma A., *J. Biochem.*, Tokyo **56**, 522 (1964).
52. Palay S. L., Karlin L. J., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 363 (1959).
53. Palay S. L., Karlin L. J., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 373 (1959).
54. Paris R., Clement G., *Proc. Exptl. Biol. Med.* **119**, 591 (1965).
55. Perlman I., Ruben S., *J. Biol. Chem.* **122**, 169 (1937).
56. Pflüger E., *Arch. Ges. Physiol.* **80**, 111 (1900).
57. Phelps P. C., Rubin C. F., Luft J. H., *Gastroenterology* **46**, 134 (1964).
58. Rostgaard J., Barrnett P. J., *Anat. Rec.* **152**, 325 (1965).
59. Sarzała M. G., 3-rd FEBS, Meeting, Warsaw, 1966, str. 284.
60. Saunders D. R., Dawson A. M., *Biochem. J.* **82**, 477 (1962).
61. Schäfer E. R., (1885), cyt. za Bloor, Biochemistry of the fatty acids. Reinhold, New York 1943.
62. Schmidt-Nielsen K., *Acta Physiol. Scand.* **12**, 1 (1946).
63. Schönheyder F., Volqvartz K., *Biochim. Biophys. Acta* **8**, 407 (1952).
64. Senior J. R., *J. Lipid. Res.* **5**, 495 (1964).
65. Senior J. R., Isselbacher K., *J. Biol. Chem.* **237**, 1454 (1962).
66. Sinclair R. G., *J. Biol. Chem.* **82**, 117 (1929).
67. Sinclair R. G., *J. Biol. Chem.* **111**, 275 (1935).
68. Sinclair R. G., *J. Biol. Chem.* **111**, 515 (1935).
69. Sinclair R. G., Smith C., *J. Biol. Chem.* **121**, 361 (1937).
70. Sjöstrand F., w Biochemical Problems of Lipids, B. B. A. Library, tom I, red. A. C. Frazer, Amsterdam 1963, str. 91.
71. Sjöstrand F., Zetterquist H., w Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids, tom III, 1955, str. 338.
72. Strauss E. W., *J. Cell Biol.* **17**, 597 (1963).
73. Strauss E. W., *J. Lipid Res.* **7**, 307 (1966).
74. Strickland K. P., Rossiter R. J., *Can. J. Biochem. Physiol.* **40**, 1051 (1962).
75. Verzar F., McDougall E. J., Absorption from the intestine, London 1936.
76. Weiss S. B., Kennedy E. P., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 3550 (1956).
77. Wilson T. H., Intestinal absorption, Saunders Company Philadelphia, London 1962.
78. Włodawer P., *Acta Biol. Exper.* **17**, 221 (1956).

MARIA SKONIECZNA*, IRENA SOPATA**, JANINA WIZE**,
ELŻBIETA WOJTECKA-ŁUKASIK**

Aktualne poglądy na strukturę i własności kolagenu

The Actual View on the Structure and Properties of Collagen

The actual views on the structure and properties of collagen are presented.

I. Występowanie i otrzymywanie kolagenu

Kolagen jest białkiem włókiennkowym (zdjęcie 1) tkanki łącznej (2) kręgowców i bezkręgowców, u których stanowi około 30% wszystkich białek. Występuje on w postaci długich, najczęściej nierozgałęzionych włókien o średnicy około mikrona w skórze, chrząstkach, ścięgnach, kościach, ścianach naczyń i w błonach pęcherza pławnego ryb.

Włókna kolagenowe stanowią 80% wszystkich składników skóry (172). Pod mikroskopem wyglądają one jak przypadkowo splecione wiązki, jednak przy oglądaniu większych obszarów skóry wyłania się określony porządek. W ścięgnach włókna kolagenowe występują w postaci długich, równoległych wiązek, które warunkują dużą sprężystość i wytrzymałość mechaniczną ścięgien. W chrząstkach włókna kolagenowe są zazwyczaj bardzo cienkie, ułożone przypadkowo i osadzone w dużej masie substancji międzykomórkowej. Włókna kolagenowe w rogówce oka ułożone są w ten sposób, że ich współczynnik załamania światła jest identyczny ze współczynnikiem substancji, w której są osadzone (60), co warunkuje przezroczystość rogówki. Podobny typ uporządkowania włókien kolagenowych występuje w przezroczystej skórze rozwijających się zarodków płazów.

Świeżo zsyntetyzowany przez fibroblasty kolagen, znajdujący się w przestrzeniach międzykomórkowych rozpuszcza się w rozcieńczonych roztworach kwasów (36, 42, 112, 120, 161, 162), buforach cytrynianowych o pH 3,5—4,0 (69, 120, 152), chłodnych roztworach obojętnych soli (37, 53, 57, 81, 86) oraz łagodnych roztworach alkali (69). Kolageny otrzymane w ten sposób z różnych tkanek określa się wspólnym terminem „kolagen

* Mgr, asystent Zakładu Biochemii Akademii Medycznej w Warszawie.

** Mgr, st. asystent Zakładu Biochemii Instytutu Reumatologicznego w Warszawie.

rozpuszczalny”, ponieważ ich roztwory zawierają makrocząsteczki tropokolagenu (TC) o tym samym kształcie, konfiguracji łańcuchów i mają podobne cechy fizykochemiczne (54, 83, 105, 106, 122). Kolagen dojrzwały znajdujący się w tkankach w postaci włókien jest białkiem nierozpuszczalnym. Można go przeprowadzić w kolagen rozpuszczalny trawiąc tkanki amylazą w pH 5,4 (115).

II. Własności kolagenu

Kolagen wyróżnia się spośród innych białek trzema charakterystycznymi cechami:

1. tworzy włókna, które w mikroskopie elektronowym wykazują poprzeczne prążkowanie powtarzające się w odstępach co 640 Å

2. ma specyficzną strukturę II-rzędową, której odzwierciedleniem jest okres identyczności 2,86 Å ustalony na podstawie interferencji promieni X

3. ma charakterystyczny skład aminokwasowy: zawiera głównie kwasy pirolidynowe (około 25%) i glicynę (około 30%) a ponadto rzadko występując w białkach zwierzęcych hydroksylizynę.

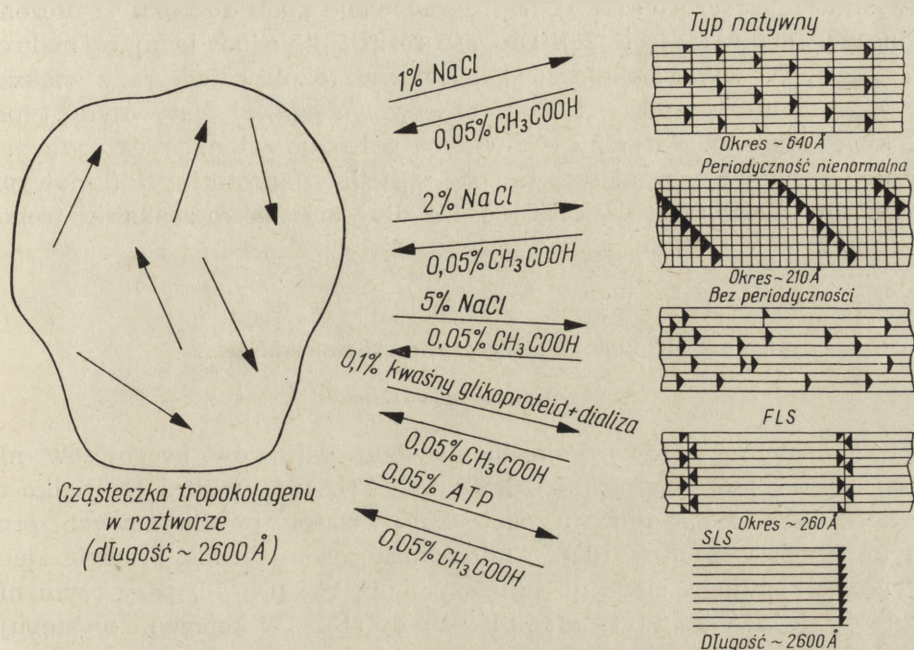
Włókna kolagenu mają charakterystyczną właściwość kurczenia się do około 1/4 początkowej długości po ogrzaniu powyżej tak zwanej temperatury kurczenia T_s (29, 41, 43), która zależy od rodzaju kolagenu. Stwierdzono, że istnieje ścisła zależność między T_s i zawartością kwasów pirolidynowych w kolagenie (15, 62, 63, 131). Włókna kolagenowe mają również zdolność pęcznienia w roztworach wodnych (167).

Kolagen natywny jest oporny na działanie nieswoistych enzymów proteolitycznych (32, 55, 80, 91, 92, 93, 117). Ulega on łatwo denaturacji cieplnej przechodząc w żelatynę i w tej postaci jest wrażliwy na działanie większości niespecyficzných proteaz. Ponieważ denaturacja nie powoduje zmian w składzie aminokwasowym prawdopodobnie zatem inna właściwość kolagenu, a nie specyficzna sekwencja reszt aminokwasowych warunkuje jego oporność. Być może decydują o tym wiązania krzyżowe, heliksowa superstruktura lub też charakterystyczna konfiguracja przestrzenna (101).

Roztwory kolagenu wykazują dużą ujemną skręcalność optyczną: przy długości fali 365 nm właściwa skręcalność optyczna wynosi -1330° (24). Wysoka jest również graniczna liczba lepkości tych roztworów, która waha się od 14 do 16 (24, 36, 96, 116, 169).

Kolagen rozpuszczony w chłodnych, obojętnych roztworach soli ulega, po ogrzaniu do temperatury ciała (37°C), spontanicznej polimeryzacji (zjawisko cieplnej precypitacji) do włókienek o średnicy rzędu od kilkuset do kilku tysięcy Å i typowym okresie periodyczności 640 Å. (4, 18, 28, 58, 174). Te rekonstruowane termicznie włókienka przechodzą po-

nownie do roztworu po ochłodzeniu, jeżeli czas inkubacji nie przekraczał kilku minut. W miarę przedłużania inkubacji coraz mniej włókienek przechodzi do roztworu po oziębieniu, a po 24 godzinach w 37°C ponad 80% włókienek pozostaje nierozpuszczone. Można to tłumaczyć zwiększaniem się w czasie inkubacji liczby wtórnych wiązań krzyżowych (39).



Schemat 1. Różne typy agregacji tropokolagenu *in vitro* (według 153)

Prawdopodobnie ruchy Browna umożliwiają stosunkowo sztywnym i strukturalnie specyficznym cząsteczkom kolagenu dopasowanie się w bardziej stabilne połączenia. Wysoki stopień oczyszczenia badanych preparatów kolagenu wyklucza możliwość udziału w tym procesie enzymów lub innych substancji.

Włókienka kolagenowe natywnego typu (zdjęcie 2a) o charakterystycznej periodyczności 640 Å można otrzymać z roztworów tego białka doprowadzając ich pH do 7, ogrzewając je do 37°C, lub dodając chlorku sodu do stężenia 1% (70).

Rozpuszczalny kolagen może precypitować z roztworu także w innych formach jak to wykazał Schmitt (153) (schemat 1). Z roztworu kolagenu w kwasie octowym po dodaniu NaCl do stężenia końcowego 2% wypadają włókienka o nienormalnej periodyczności 210 Å, a przy 5% stężeniu końcowym NaCl — włókienka nie mające periodyczności. Długie, niespolaryzowane formy tak zwane FLS (ang. *fibrous long spacing*) wypadają z roztworu kolagenu po dodaniu małych ilości kwaśnego glikoproteidu (zdjęcie 2b). W formach tych makrocząsteczki TC

połączone są „koniec do końca” i zagregowane „bok do boku” w ten sposób, że leżą jedna pod drugą. Ten typ uporządkowania warunkuje okres identyczności około 2600 Å. Dodanie ATP do kwaśnych roztworów kolagenu powoduje jego precypitację w postaci długich spolaryzowanych segmentów tak zwanych SLS (ang. *segment long spacing*), w których wszystkie makrocząsteczki TC są zagregowane „bok do boku” i ułożone jedna pod drugą (zdjęcie 2c). Długość form SLS odpowiadająca makrocząsteczce TC wynosi około 2600Å, jest więc około cztery razy większa od okresu identyczności 640 Å obserwowanego w natywnym typie włókien kolagenu. Natywny typ włókna powstaje zatem przez podłużne, jednokierunkowe przemieszczenie się sąsiednich protofibril (liniowych polimerów makrocząsteczek TC) o 1/4 długości makrocząsteczki tropokolagenu.

III. Budowa makrocząsteczki tropokolagenu

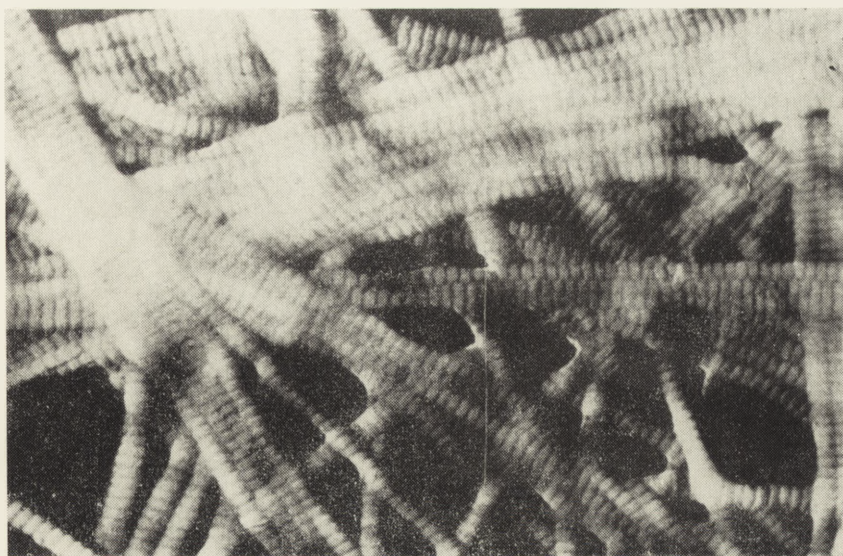
1. Skład aminokwasowy

Skład aminokwasowy kolagenów wielu gatunków kręgowców nie różni się w sposób istotny (25, 26, 95, 114, 131, 164) (tablica 1). Białko to zawiera 33% ($\pm 5\%$) glicyny, około 25% kwasów pirolidynowych, proliny i hydroksyproliny (60). Aminokwasy aromatyczne i zawierające siarkę występują w stężeniu mniejszym niż 1% (64, 70) przy czym nie stwierdzono obecności tryptofanu i cysteiny (152). W kolagenie występuje około 1% hydroksylizyny (69). Jej obecność uważana jest za bardziej charakterystyczną cechę kolagenu niż występowanie hydroksyproliny, która znajduje się w dużych ilościach także w specyficznych białkach roślinnych (64).

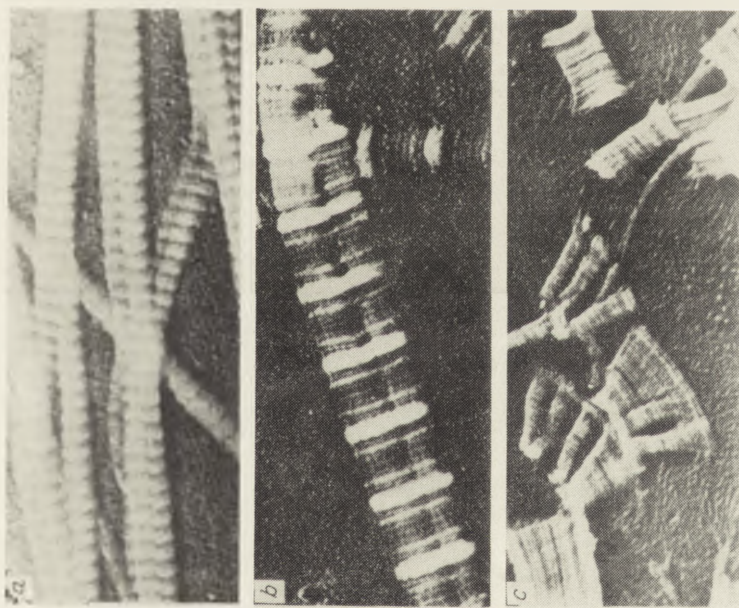
Kolagen bezkręgowców (108, 130, 158, 170, 171, 173) zawiera około 30% glicyny podobnie jak u kręgowców, natomiast zawartość proliny waha się w granicach 13 do 280 reszt, a hydroksyproliny od 24 do 165 reszt na 1000 reszt aminokwasowych.

Chandrarajan i Bose (19) badając kolagen rozpuszczalny w solach obojętnych, cytrynianach i kwasach stwierdzili, że w makrocząsteczce TC C-końcowymi aminokwasami są: glicyna, alanina i leucyna, a N-końcowymi — kwas asparaginowy i glicyna.

W celu ustalenia sekwencji aminokwasów w kolagenie trawiono go za pomocą specyficznych bakteryjnych kolagenaz w pH 6,4—7,5 (34, 39, 101). Kolagenaza odszczepia z kolagenu różniące się wielkością peptydy, w których N-końcowym aminokwasem jest głównie glicyna (48, 72, 73, 109), a C-końcowymi — hydroksyprolina i alanina (72, 87, 100, 109). Z analizy tych peptydów wynika, że makrocząsteczka tropokolagenu nie ma jednakowej budowy na całej swojej długości. Składa się ona z dwóch, wyraźnie różnych, powtarzających się obszarów: polar-



Rys. 1. Zdjęcie natywnych włókien kolagenu uzyskane w mikroskopie elektronowym (według 60)



Rys. 2. Zdjęcia natywnych włókien kolagenu (a), form FLS (b) i form SLS (c) uzyskane w mikroskopie elektronowym (według 60)



Rys. 3. Zdjęcie makrocząsteczek kolagenu uzyskane w mikroskopie elektronowym
(według 74)

T a b l i c a 1

Skład aminokwasowy kolagenów kręgowców i bezkręgowców (wg 169)

Aminokwas	Kręgowce						Bezkręgowce		
	Ściegno ludzkie	Skóra cielęca	Skóra szczura	Skóra żaby	Skóra krokodyla	Pęcherz pławny karpia	<i>Annelida (Lumbricus)</i>	<i>Nemathelminthes (Ascaris)</i>	<i>Echinodermata (Thyone)</i>
Ilość reszt/1000 reszt aminokwasowych									
Alanina	110,7	112	106	98	114	126	103	69	113
Glicyna	324	320	327	301	324	325	324	286	306
Walina	25,4	20	22	21,9	15,4	18	17	13	30
Leucyna	26	25	25	28,8	20,1	21	29	18	22
Izoleucyna	11,1	11	10	14	11,4	10	15	14	13
Prolina	126,4	138	117	109,7	127,9	116	13	280	109
Fenylalanina	14,2	13	13	19,3	17,7	14	5,2	7,3	8,9
Tyrozyna	3,6	2,6	3,2	6,1	3,3	2	—	1,2	7,9
Seryna	36,9	36	41	66,3	42,1	37	105	23	43
Treonina	18,5	18	20	26,4	22	29	52	18	35
Metionina	5,7	4,3	6,3	8,7	6,5	13	—	12	2,2
Arginina	49	50	49	49,2	49,5	53	21	42	54
Histydyna	5,4	5	5,1	6,5	4,7	—	—	8,4	2,8
Lizyna	21,6	27	29	29,1	25,3	26	15	37	7,5
Kwas asparaginowy	48,4	45	47	54,9	45,5	47	56	76	62
Kwas glutaminowy	72,3	72	74	77,9	72,8	71	81	101	110
Hydroksyprolina	92,1	94	100	77,5	92,8	81	165	24	60
Hydroksylizyna	8,9	7,4	5,7	4,3	4,9	7,4	—	—	11
Cystyna	—	—	—	—	—	—	—	—	2,5

nych (amorficznych) i niepolarnych (krystalicznych) (3, 35, 64). Te ostatnie stanowią 50—60% makrocząsteczek (34, 109). Badania preparatów kolagenu barwionych kwasem fosforowalframowym lub solami uranu wykazały, że obszarom polarnym odpowiadają na obrazie z mikroskopu elektronowego pasma, a niepolarnym obszary międzypasmowe występujące naprzemian wzdłuż całej makrocząsteczki TC (75, 118). Niepolarne obszary zawierają powtarzającą się sekwencję aminokwasów: Gli-Pro-x-Gli, gdzie x jest zwykle alaniną lub hydroksyproliną (34, 64). Kolagenaza rozszczepia wiązanie peptydowe między x-Gli i dlatego powstają z tych obszarów peptydy: Gli-Pro-ProOH i Gli-Pro-Ala. Polarne obszary prawdopodobnie nie mają takiej sekwencji aminokwasów, gdyż po enzymatycznym trawieniu kolagenu otrzymuje się również większe peptydy, zawierające przeciętnie około 11 do 15 reszt aminokwasowych. Na podstawie tych badań ustalono następującą sekwencję aminokwasów w makrocząsteczce TC:

$-(\text{Gli-Pro-x})_n$ — polarny region $-(\text{Gli-Pro-x})_n$ — polarny region
gdzie $n = 5-7$.

2. Składniki cukrowe

W skład makrocząsteczki TC wchodzi również cukrowce, których zawartość zależy od rodzaju kolagenu (6, 16, 45, 47, 77, 90). Gross i wsp. (56) wykazali, że w kolagenach kręgowców występuje głównie glukoza i galaktoza w ilościach od 0,6 do 2% oraz śladowe ilości innych heksoz, pentoz i heksozoamin. Wyjątek stanowi wiotryna (kolagen płynu ocznego), zawierająca 10% heksoz i 4% heksozoamin: glukozaminy i galaktozaminy. Blumenfeld i wsp. (6) stwierdzili, że ichtiokol zawiera 1,4 ($\pm 0,1$) reszt glukozy i 2,1 ($\pm 0,2$) reszt galaktozy na 1000 reszt aminokwasowych, co odpowiada 5 resztom glukozy i 7 resztom galaktozy na makrocząsteczkę TC o ciężarze cząsteczkowym 320 000.

Kolagen bezkręgowców zawiera od 5 do 15% cukrowców. Oprócz glukozy i galaktozy znaleziono w nim duże ilości glukozaminy, galaktozaminy, mannozy, fukozy kwasów uronowych i arabinozy (56, 59).

Sposób w jaki cukrowce łączą się z łańcuchami polipeptydowymi w makrocząsteczce TC nie jest dostatecznie wyjaśniony. Grassman i wsp. (46) oraz Blumenfeld i wsp. (6) przypuszczają, że heksozy połączone są z białkiem wiązaniem O-glikozydowym. Według Gallopa (39) heksozy mogą się łączyć z łańcuchami polipeptydowymi także wiązaniami estrowymi. Butler i wsp. (16, 17) wykazali, że heksozy występują głównie w zasadowych obszarach makrocząsteczki TC i łączą się z poszczególnymi łańcuchami polipeptydowymi wiązaniami O-glikozydowymi poprzez grupy hydroksylowe hydroksylizyn. Autorzy ci proponują następującą sekwencję tych zasadowych obszarów: -Gli-Met-LizOH-(glukoza + galaktoza)-Gli-His-Arg-.

3. Makrocząsteczka tropokolagenu

Makrocząsteczka TC ma postać długiego, sztywnego pręta o wymiarach około 2900 Å x 15 Å (zdjęcie 3), a jej ciężar cząsteczkowy wynosi około 350 000. Wartości te ustalone dla monomeru ichtiokolu (kolagen otrzymany z błon pęcherzy pławnych ryb) przez Boedtkera i Doty (9), potwierdzili Hall i Doty (67, 68) na podstawie badań w mikroskopie elektronowym. Podawane dla różnych preparatów wartości ciężaru cząsteczkowego wahają się zależnie od sposobu badania i metod otrzymywania kolagenu. Na przykład dla kolagenu skóry cielęcej Rice i wsp. (143) podali ciężar cząsteczkowy 250 000 do 310 000, a Davison i Drake (23) — 260 000 ($\pm 10\,000$).

Model makrocząsteczki kolagenu opracowali Ramachandran i Karth (141), a następnie zmodyfikowali Rich i Crick (144, 145).

Makrocząsteczka ta składa się z trzech łańcuchów polipeptydowych (52), z których każdy jest lewoskrętnym α -heliksem o konfiguracji poli-L-proliny II lub poli-L-glicyny II (21, 22). Ich lewoskrętność uwarunkowana jest wysoką zawartością kwasów pirolidynowych (60). Te trzy polipeptydowe łańcuchy związają się wokół wspólnej osi wytwarzając spiralę prawoskrętną. Łańcuchy polipeptydowe połączone są wiązaniami wodorowymi utworzonymi przez reszty glicyny (5). Przy ogrzewaniu roztworu kolagenu powyżej temperatury denaturacji (tzn. powyżej 40°C),

Tablica 2

Skład aminokwasowy poszczególnych łańcuchów w makrocząsteczce TC (wg 134)

Aminokwas	kolagen	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$
	ilość reszt/1000 reszt aminokwasowych			
Hydroksyprolina	54	56	60	61
Kwas asparaginowy	51	50	56	51
Treonina	23,2	21,4	25,9	23,2
Seryna	66	68	68	70
Kwas glutaminowy	75	77	63	80
Prolina	98	99	97	95
Glicyna	347	345	340	352
Alanina	111	125	109	101
Walina	19,8	14,6	21,1	20,8
Metionina	16,7	14,2	16,9	15,7
Izoleucyna	11,0	10,3	10,8	9,1
Leucyna	20,6	17,9	24,2	17,3
Tyrozyna	3,6	1,0	6,4	2,5
Fenylalanina	11,5	13,6	7,9	11,5
Hydroksylizyna	6,6	5,0	8,3	4,8
Lizyna	26,2	29,0	20,3	28,7
Histydyna	7,7	4,6	11,6	6,5
Arginina	52	50	54	50

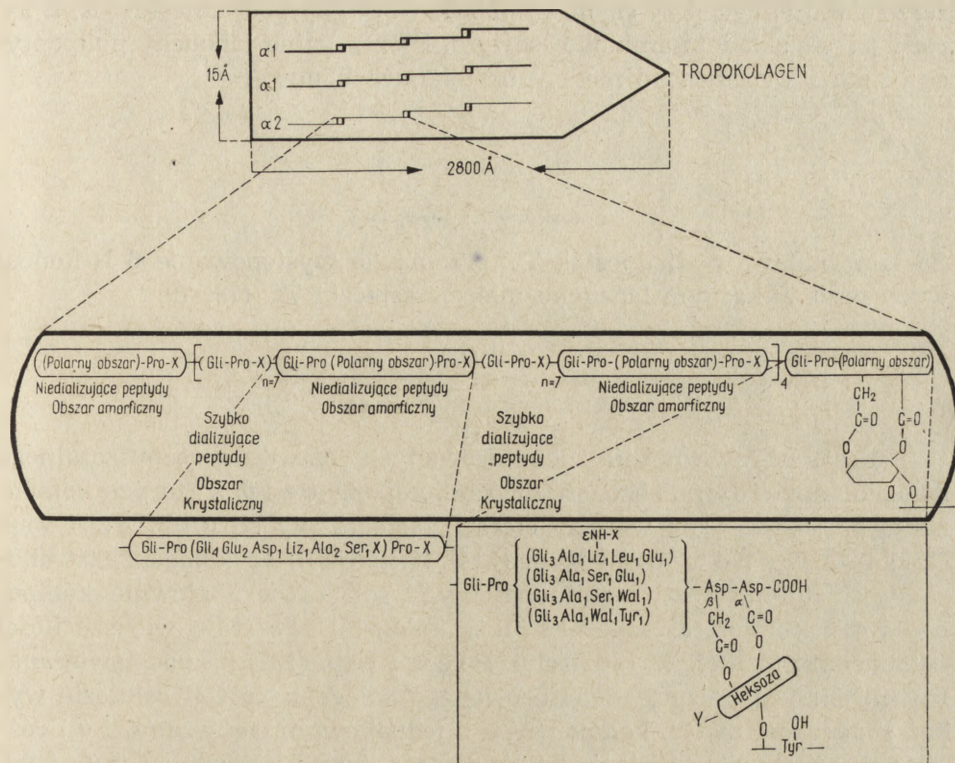
a także po dodaniu dużych ilości mocznika lub guanidyny struktura spiralna zostaje zniszczona, a poszczególne łańcuchy polipeptydowe oddzielają się od siebie (154).

Analiza chromatograficzna wykazała, że jeden z łańcuchów różni się wyraźnie składem aminokwasowym od dwóch pozostałych (10, 11, 96, 97, 132, 133). Łańcuchy te oznaczono symbolami $\alpha 1$ i $\alpha 2$ i przyjęto, że makrocząsteczka TC zawiera dwa łańcuchy $\alpha 1$ i jeden łańcuch $\alpha 2$. W 1964 roku Piez (134) badając kolagen skóry dorsza stwierdził jednak, że wszystkie trzy łańcuchy polipeptydowe różnią się między sobą składem aminokwasowym i oznaczył je: $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ (tablica 2). Największe różnice stwierdził w zawartości następujących aminokwasów: lizyny, alaniny, tyrozyny, hydroksylizyny i histydyny. Hydroksyprolina występująca we wszystkich trzech łańcuchach została zidentyfikowana jako 4-hydroksyprolina (135). Piez wysunął hipotezę — że również w kolagenach innych gatunków zwierząt występują trzy różne łańcuchy polipeptydowe, co potwierdzili Borstein i wsp. (12) oraz Heidrich i wsp. (71), którzy badali kolagen skór szczura i cielaka.

Obecnie przyjmuje się, że poszczególne łańcuchy składają się około 1000 reszt aminokwasowych i mają ciężar około 95 000 (71, 135).

4. Podjednostkowe modele makrocząsteczki TC

Polipeptydowe łańcuchy wchodzące w skład makrocząsteczki TC według Gallopa (39) zbudowane są z podjednostek połączonych wiązaniami kowalencyjnymi. Pod działaniem hydrazyny lub hydroksylaminy w odpowiednio łagodnych warunkach (roztwór 1M, pH 10, temperatura 40°C) następuje fragmentacja łańcuchów polipeptydowych do podjednostek o ciężarze około 30 000 (5, 7, 8). Z ilości otrzymanych hydrazydów obliczono, że w jednym łańcuchu polipeptydowym zostaje rozerwanych 6 wiązań estrowych, to znaczy 18 na całą makrocząsteczkę TC. Według modelu Gallopa (schemat 2) każdy łańcuch α w makrocząsteczce TC składa się z czterech podjednostek o ciężarze około 30 000, połączonych ze sobą parami wiązań typu estrowego. W wiązaniach tych biorą udział α i β karboksylowe grupy kwasu asparaginowego znajdujące się blisko C-końca każdej podjednostki łańcucha polipeptydowego. Dwa sąsiednie wiązania estrowe oddzielone są od siebie najwyżej przez siedem reszt aminokwasowych. Opierając się na danych Franzblau i wsp. (33), że stosunek estrów do heksoz wynosi 2 : 1, a tyrozyny do heksoz 1 : 1 Gallop (39) podał następujący sposób powstawania wiązania krzyżowego: grupa α karboksylowa jednej i grupa β karboksylowa drugiej reszty kwasu asparaginowego wiążą się z grupami hydroksylowymi heksozy tworząc parę wiązań estrowych, a heksoza łączy się wiązaniem O-glikozydowym z tyrozyną sąsiedniej podjednostki; reakcje transestryfikacji prowadzą następnie do powstawania wiązań wewnątrzcząsteczkowych i międzycząsteczkowych.



Schemat 2. Model podjednostki tropokolagenu (według 39)

X — zwykle alanina lub hydroksyprolina; Y — nieznaną węglowodan

Udział heksoz w powstawaniu wiązań krzyżowych nie jest jednak dostatecznie wyjaśniony. Według Blumenfelda i wsp. (6) grupy hydroksylowe glukozy przy węglu 2, 3, 4 i galaktozy przy węglu 2, 3, 4 i 6 są wolne, ponieważ dają się utlenić kwasem nadjodowym, zatem heksozy prawdopodobnie nie biorą udziału w powstawaniu kowalencyjnych wiązań krzyżowych.

Na podstawie badań w mikroskopie elektronowym agregatów kolagenu typu SLS barwionych kwasem fosforowolframowym Petruska i Hodge (129) zaproponowali inny podjednostkowy model tropokolagenu. Stwierdzili oni występowanie dwóch różnych podjednostek δ_1 i δ_2 w łańcuchach polipeptydowych. W skład δ_1 wchodzi 210 ± 7 reszt aminokwasowych, a w skład δ_2 — 150 ± 5 . Petruska i Hodge sądzą, że łańcuch polipeptydowy α_1 zbudowany jest z 5 podjednostek δ_1 , a łańcuch α_2 z 7 podjednostek δ_2 . Każdy łańcuch polipeptydowy zawierałby zatem około 1050 ± 35 reszt aminokwasowych.

Gallop (40) uwzględniając wyniki badań Pieza (134) zaproponował jeszcze jeden podjednostkowy model tropokolagenu. W tym modelu każdy łańcuch polipeptydowy składa się z 6 podjednostek o cię-

zarze około 17 000, przy czym występują trzy typy podjednostek: A, B i C różniące się składem aminokwasowym. Poszczególne łańcuchy polipeptydowe mają według tego modelu następującą budowę:

$$\alpha 1 = 3A + 2B + C$$

$$\alpha 2 = 3C + 2A + B$$

$$\alpha 3 = 3B + 2C + A$$

Za taką budową podjednostek TC przemawia występowanie 6 N-końcowych reszt w każdym łańcuchu makrocząsteczki TC (78, 79).

IV. Komponenty kolagenu

Podczas ultrawiorowania zdenaturowanych roztworów rozpuszczalnego kolagenu stwierdzono obecność dwóch komponent α i β , z których komponenta β ma dwa razy większy ciężar cząsteczkowy od α . Piez i wsp. (132) i Orekhovich i wsp. (124) stwierdzili, że kolagen ekstrahowany chłodnymi roztworami obojętnych soli zawiera głównie komponentę α , natomiast kwaśne ekstrakty kolagenu zawierają większe ilości komponenty β (121). W 1961 roku Piez i wsp. (132) na podstawie analizy chromatograficznej zdenaturowanego kolagenu na CM-celulozie wykazali obecność dwóch komponent α o jednakowym ciężarze (α_1 i α_2) różniących się składem aminokwasowym oraz dwóch komponent β (β_1 i β_2). Komponenty β są dimerami składającymi się z dwóch łańcuchów polipeptydowych połączonych wiązaniami kowalencyjnymi (49, 132): komponenta β_1 składa się z łańcuchów $\alpha 1$ i $\alpha 2$, a komponenta β_2 z dwóch łańcuchów $\alpha 1$. Równocześnie znaleziono jeszcze jedną frakcję w kolagenie rozpuszczalnym, nazwano ją komponentą γ (1, 55, 142, 166). Stanowi ona około 10% rozpuszczalnej frakcji kolagenu i jest trimerym, w którym trzy łańcuchy polipeptydowe α połączone są wiązaniami krzyżowymi. Uwzględniając ostatnie doniesienia o występowaniu trzech różnych łańcuchów α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) w makrocząsteczce TC (71, 134, 135) przyjmuje się obecnie nową nomenklaturę komponent (24):

$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ dla komponent α — które odpowiadają łańcuchom $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$

$\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ dla komponent β

γ_{123} dla komponenty γ

Powstają one przez wytworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań krzyżowych.

Istnieją jeszcze komponenty innego typu, powstające przez wytworzenie międzycząsteczkowych wiązań krzyżowych na przykład:

$$\beta_{11}, \beta_{23}, \gamma_{131}, \gamma_{2'31},$$

W komponentach tych łańcuchy pochodzące z różnych makrocząsteczek TC oznaczono przecinkami ' i ''.

W świeżo zsyntetyzowanych makrocząsteczkach TC łańcuchy polipeptydowe nie są połączone między sobą wiązaniami krzyżowymi. W początkowym stadium dojrzewania kolagenu powstaje niewielka ilość wewnątrzcząsteczkowych wiązań krzyżowych. Dalszy proces dojrzewania kolagenu jest uwarunkowany powstawaniem między cząsteczkowych wiązań krzyżowych (168). Charakter wiązań krzyżowych łączących poszczególne łańcuchy polipeptydowe nie jest dostatecznie wyjaśniony. Gallop i wsp. (38, 39) postulują, że są one typu estrowego i bierze w nich udział nie zidentyfikowana komponenta aldehydowa. Sposób połączenia tej komponenty z łańcuchem polipeptydowym jest nieznan. Daje ona reakcje charakterystyczne dla nienasyconych aldehydów i występuje w ilości 1 do 2 równoważników na makrocząsteczkę TC (146). Badania w mikroskopie elektronowym wykazały, że aldehydy zgrupowane są przy końcu makrocząsteczki TC (147). Komponenta aldehydowa prawdopodobnie nie łączy się wiązaniem estrowym z kwasem glutaminowym i asparaginowym, ani wiązaniem glikozydowym z seryną, ani też nie jest połączona z treoniną, lizyną, hydroksylizyną, proliną, hydroksyproliną, argininą, histydyną i tyrozyną (148).

Mechanic i Levy (107) postulują, że w wiązaniu krzyżowym bierze udział ϵ aminowa grupa lizyny i γ karboksylowa grupa kwasu glutaminowego. Według Bornsteina i wsp. (13, 14) są to reszty lizyny, znajdujące się blisko N-końców α łańcuchów polipeptydowych ϵ -aminowe grupy lizyn są utleniane na drodze oksydatywnej dezaminacji do grup aldehydowych. Wewnątrzcząsteczkowe wiązanie krzyżowe powstaje w wyniku kondensacji aldolowej aldehydów znajdujących się w dwóch sąsiednich łańcuchach. Związkiem pośrednim w tej reakcji jest prawdopodobnie δ -semialdehyd kwasu α -aminoadypinowego. Mechanizm powstawania wiązania międzycząsteczkowego jest przypuszczalnie inny: udział w nim biorą ϵ -aminowa grupa lizyny jednej makrocząsteczki TC i grupa aldehydowa drugiej makrocząsteczki.

Ważnych danych o strukturze kolagenu dostarczają badania nad wpływem niespecyficznych enzymów proteolitycznych na to białko. W 1960 roku Hodge (76) wykazał, że pepsyna i trypsina odszczepiają z końców łańcuchów polipeptydowych makrocząsteczki TC krótkie łańcuchy peptydowe, które to peptydy, jak przypuszczał, mogą odgrywać ważną rolę w procesach polimeryzacji kolagenu. Zagadnieniem budowy i funkcji tych peptydów nazwanych telopeptydami (151) zajmowało się wielu badaczy (24, 44, 66, 119, 151, 152, 155, 156, 163). Ciężar cząsteczkowy telopeptydów wynosi około 15 000. Ich skład aminokwasowy różni się wyraźnie od składu makrocząsteczki TC (tablica 3). Telopeptydy nie zawierają cukrów, charakteryzuje je wysoka zawartość tyrozyny, sięgająca 30—50% zawartości tego aminokwasu w kolagenie natywnym, a w peptydach odszczepianych przez pepsynę nie ma hydroksyproliny.

Badania Drake i wsp. (24) nad wpływem enzymów proteolitycz-

T a b l i c a 3

Skład aminokwasowy telopeptydów odszczepionych przez różne enzymy (wg 24)

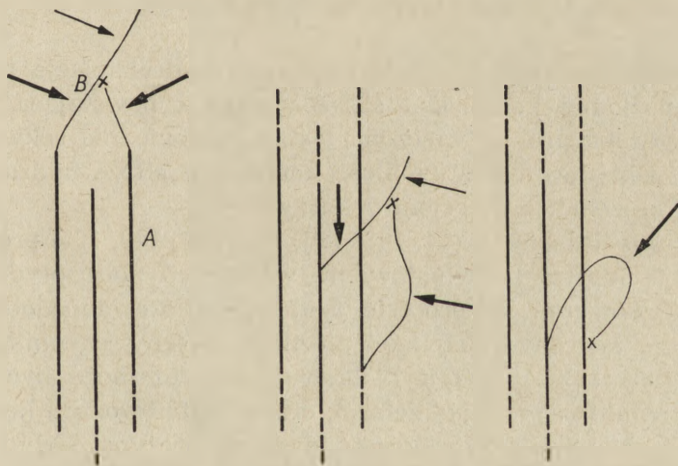
Aminokwasy	Pronaza	Elastaza	Chymotryp- syna	Trypsyna	Pepsyna
	ilość reszt aminokwasowych/mol kolagenu				
Hydrokso- prolina	6	2	1	2	0
Kwas aspara- ginowy	10	3	5	3	2
Treonina	3	0	1	0	0
Seryna	8	1	5	2	1
Kwas gluta- minowy	10	4	7	4	4
Prolina	17	3	4	4	2
Glicyna	30	6	9	11	4
Alanina	9	2	3	3	1
Walina	3	0	1	1	0
Metionina	1	0	0	0	0
Izoleucyna	3	0	1	0	0
Leucyna	6	4	4	2	3
Tyrozyna	7	3	3	3	4
Fenylalanina	5	2	3	1	3
Hydroksyli- zyna	1	0	0	0	0
Lizyna	2	0	1	1	0
Histydyna	1	1	1	1	1
Arginina	6	1	1	2	1

nych o różnej specyficzności dostarczyły wielu danych wyjaśniających rolę i budowę telopeptydów. Trypsyna, pepsyna, chymotrypsyna i elastaza uwalniają z kolagenu 1—3% materiału peptydowego i działanie tych enzymów zakończone jest po upływie 24 godzin. Natomiast pronaza w ciągu 24 godzin uwalnia około 5% materiału peptydowego, a później dalsze ilości peptydów. Prawdopodobnie pronaza w pierwszym etapie (24 godz.) odszczepia telopeptydy, a następnie trawi główny heliks makrocząsteczki TC. Peptydy odszczepiane przez pronazę są mniejsze od peptydów odszczepianych przez pepsynę. Pronaza odrywa od makrocząsteczki TC 15 peptydów, z których sześć ma charakter kwaśny, sześć — zasadowy, a trzy — obojętny. (150). Kwaśne peptydy nie zawierają aminokwasów zasadowych, natomiast w zasadowych peptydach stwierdzono aminokwasy kwaśne. Interesującą cechą jest powtarzająca się sekwencja w peptydach zasadowych typu Gli-Liz-Gli i Gli-Arg-Gli oraz w peptydach kwaśnych typu Gli-Glu-Gli. Oddzielenie telopeptydów nie wpływa na obraz struktury makrocząsteczki TC w mikroskopie elektro-
nowym ani na tworzenie charakterystycznych form SLS (24, 151). Fakt, że enzymy z wyjątkiem pronazy nie trawią głównego heliksu makro-

cząsteczki TC sugeruje, że telopeptydy znajdują się na końcach łańcuchów lub stanowią ich boczne odgałęzienia leżące na zewnątrz trójheliksowej struktury.

Do tego wniosku doszedł także Rubin (151) badając wpływ pepsyny na oczyszczony kolagen skóry cielęcej. Ilość N-końcowych grup w makrocząsteczce TC wykazuje, że istnieje przynajmniej 15 miejsc, w których mogą być przyłączone telopeptydy (150). Obecnie przyjmuje się, że makrocząsteczka TC ma wygląd pręta z bocznymi odgałęzieniami (ang. *hairy rod*).

Po działaniu enzymów proteolitycznych: pepsyny, elastazy, chymotrypsyny i pronazy na kolagen otrzymuje się wyraźną zmianę w stosunku komponent $\alpha : \beta : \gamma$, natomiast w przypadku działania trypsyny nie stwierdzono wyraźnych zmian (24, 151, 152). Dane te sugerują, że telopeptydy biorą udział w tworzeniu wiązań krzyżowych łączących dwa sąsiednie łańcuchy pochodzące z tej samej lub sąsiedniej cząsteczki. Pepsyna prawdopodobnie odszczepia łańcuchy telopeptydów z równoczesnym rozerwaniem wiązania krzyżowego, natomiast trypsyna odszczepia tylko te telopeptydy, które nie biorą udziału w tworzeniu wiązania krzyżowego. Prawdopodobny sposób przyłączenia telopeptydów do makrocząsteczki TC przedstawia schemat 3.



Schemat 3. Możliwości umiejscowienia telopeptydów i wiązań krzyżowych w tropokolagenie (według 24)

gruba strzałka — proteoliza powodująca rozerwanie wiązania krzyżowego, cienka strzałka — proteoliza nie powodująca rozerwania wiązania krzyżowego, X — wiązanie krzyżowe, A — łańcuch α , B — telopeptyd

Telopeptydy stanowiące najbardziej zewnętrzną a więc najłatwiej dostępną część struktury makrocząsteczki TC mogą odgrywać ważną rolę w agregacji i warunkować własności fizjologiczne kolagenu (150).

V. Metabolizm kolagenu

Monomeryczna jednostka kolagenu rozpuszczalnego (tropokolagenu TC) syntetyzowana jest w fibroblastach na mikrosomach według schematu ogólnie przyjętego dla biosyntezy innych białek (99, 125, 128, 138). Green i Lowter (99) wyodrębnili z mikrosomalnej frakcji białko w wysokim stopniu znakowane ^{14}C -proliną, zdolne do tworzenia *in vitro* poprzecznie prążkowanych fibryl i stwierdzili, że jest ono świeżo zsyntetyzowanym kolagenem. Badacze ci nie wykazali pozakomórkowej syntezy kolagenu.

Kretsinger i wsp. (89) doszli do wniosku, że synteza kolagenu jest związana z polisomami. Natomiast Konno i Tetsuka (88) na podstawie badań przeprowadzonych *in vitro* na materiale z ziarniniaka stwierdzili, że tworamı bardziej aktywnymi są cięższe cząstki zawarte we frakcji 85S, które pojawiają się w fibroblastach (159) podczas intensywnej biosyntezy kolagenu. Według Kajikawa i wsp. (85) cząstki te są identyczne z ergastoplazmą.

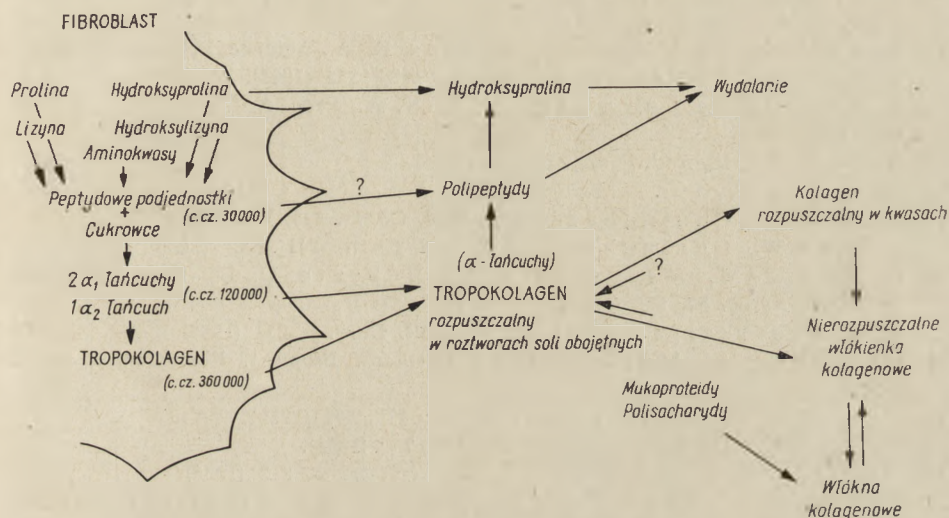
W biosyntezie kolagenu bierze udział 18 aminokwasów. Egzogenna hydroksyprolina nie bierze udziału w biosyntezie kolagenu (50, 88, 160), lub jej udział jest minimalny (111). Hydroksyprolina i hydroksylizyna powstają drogą hydroksylacji proliny i lizyny (157), dotychczas nie wiadomo jednak, na którym etapie biosyntezy kolagenu ma miejsce ta hydroksylacja.

Jedna grupa badaczy (20, 102) uważa, że hydroksylacja proliny zachodzi na poziomie kompleksu sRNA-prolina i powstająca w formie aktywnej hydroksyprolina włączona jest w odpowiednią sekwencję łańcuchów polipeptydowych. Małą ilość kompleksu sRNA-hydroksyprolina wyodrębniono z tkanek embrionów kurzych.

Według innych badaczy (84, 103, 126, 127, 139, 140, 165) prolina ulega hydroksylacji dopiero po wbudowaniu w łańcuch polipeptydowy związany z mikrosomami. W procesie tym bierze prawdopodobnie udział specyficzny enzym hydroksylaza, nieenzymatyczny czynnik występujący w rozpuszczalnej frakcji białkowej, którym może być związany z białkiem metal (na przykład żelazo), oraz donator wodoru (kwas askorbinowy lub 2-amino-4-hydroksydwumetylopterydyna). Hydroksylacja proliny przebiega tylko w warunkach tlenowych, a pobierany tlen pochodzi wprost z tlenu cząsteczkowego (27, 30, 37, 94, 137). Proces hydroksylacji lizyny i proliny rozpoczyna się wtedy, gdy te dwa aminokwasy włączone są w określoną sekwencję łańcucha peptydowego mającego odpowiednią wielkość (165). Na dalszych etapach hydroksylacja proliny i lizyny przebiega równocześnie z syntezą łańcucha polipeptydowego.

Sposób w jaki makrocząsteczki tropokolagenu wydostają się z komórki do przestrzeni międzykomórkowej jest dotychczas niewyjaśniony. Porter i Pappas (136) przypuszczają, że zsyntetyzowane wewnątrz fibro-

blastów makrocząsteczki tropokolagenu ulegają liniowej polimeryzacji do protofibryli, które są wyrzucane do przestrzeni międzykomórkowych. Procesom tym towarzyszy rozerwanie błony komórkowej, co wykazano na podstawie badań w mikroskopie elektronowym. Gross (61) natomiast uważa, że do przestrzeni międzykomórkowych są wyrzucane pojedyncze makrocząsteczki tropokolagenu, tworzące tam zawieszinę półpłynnych kryształów. W przestrzeniach międzykomórkowych przebiega proces dojrzewania kolagenu. Utworzone z makrocząsteczek tropokolagenu protofibryle ulegają agregacji „bok do boku”, charakteryzującej się przesunięciem sąsiednich protofibryl względem siebie o odcinek równy $1/4$ długości makrocząsteczki TC. W wyniku tego uporządkowania powstają włókienka z poprzecznym prążkowaniem powtarzającym się co około 640 Å.



Schemat 4. Metabolizm kolagenu (według 39)

Podczas dojrzewania kolagenu luźne włókienka rozpuszczalne przechodzą w nierozpuszczalne (51, 83) wskutek powstawania dużej liczby międzycząsteczkowych wiązań krzyżowych. Włókienka nierozpuszczalne tworzą prawdopodobnie kompleksy z mukoproteidami, mukopolisacharydami, lipidami i innymi związkami znajdującymi się w substancji podstawowej tkanki łącznej i razem formują różne rodzaje włókien kolagenowych (104). Tak uformowane nierozpuszczalne włókna kolagenowe można otrzymać z tkanki po mechanicznym usunięciu materiału niekolagenowego (114) lub po termicznej zmianie kolagenu w rozpuszczalną żelatynę (82). Powstawanie kolagenu przedstawia schemat 4.

Metaboliczny obrót kolagenu w organizmie jest bardzo niski (98, 110, 113, 123, 149), (wyjątek stanowi macica po porodzie), to też włókna kolagenowe znajdujące się w tkankach przez wiele lat nie ulegają żadnym zmianom.

LITERATURA

1. Altgelt K., Hodge A. J., Schmidt F. O., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 1914 (1961).
2. Astbury W. T., *Trans. Faraday Soc.* **34**, 377 (1938). cytowane za Gross J., *Comparative Biochemistry*, red. Florin M., Mason H. S., New York 1963, str. 307.
3. Bear R. S., *Adv. Protein Chem.* **7**, 69 (1952).
4. Bensusan H. B., Hoyt B. L., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 719 (1958).
5. Blumenfeld O. O., Gallop P. M., *Biochemistry* **1**, 947 (1962).
6. Blumenfeld O. O., Paz M. A., Gallop P. M., Seifter S., *J. Biol. Chem.* **238**, 3835 (1963).
7. Blumenfeld O. O., Rojkind M., Gallop P. M., *Biochemistry* **4**, 1780 (1965).
8. Blumenfeld O. O., Gallop P. M., *Fed. Proc.* **24**, 358 (1965).
9. Boedtker H., Doty P., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4267 (1956).
10. Bornstein P., Piez K. A., *J. Clin. Invest.* **43**, 1813 (1964).
11. Bornstein P., Martin G. R., Piez K. A., *Science* **144**, 1220 (1964).
12. Bornstein P., Piez K. A., *Science* **148**, 1353 (1965).
13. Bornstein P., Kang A. H., Piez K. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 417 (1966).
14. Bornstein P., *Fed. Proc.* **25**, 1004 (1966).
15. Burge R. E., Hynes R. D., *J. Mol. Biol.* **1**, 155 (1959).
16. Butler W., Cuninghame J., *J. Biol. Chem.* **240**, PC 3449 (1965).
17. Butler W., Cuninghame J., *J. Biol. Chem.* **241**, 3882 (1966).
18. Cassel J. M., Mandelkern L., Roberte D. E., *J. Am. Leather Chemists Assoc.* **57**, 556 (1962).
19. Chandrarajan J., Bose S. M., *Coll. Curr.* **6**, 251 (1966).
20. Coronado A., Mardones E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **13**, 75 (1963).
21. Cowan P. M., Mc Gavin S., *Nature* **176**, 501 (1955).
22. Crick F. H. C., Rich A., *Nature* **176**, 780 (1955).
23. Davison P. F., Drake P. M., *Biochemistry* **5**, 313 (1966).
24. Drake M. P., Davison P. F., Bump S., Schmidt F. O., *Biochemistry* **5**, 301 (1966).
25. Eastoe J. E., *Biochem. J.* **61**, 589 (1955).
26. Eastoe J. E., *Biochem. J.* **65**, 363 (1957).
27. Ebert P. S., Prockop D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 305 (1962).
28. Fessler J. H., *Biochem. J.* **76**, 452 (1960).
29. Flory P. J., Garrett R. R., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4836 (1958).
30. Fojimoto D., Tamiya N., *Biochem. J.* **84**, 333 (1962).
31. Fojimoto D., *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 559 (1963).
32. Frankland D. M., Wynn C. H., *Biochem. J.* **85**, 276 (1962).
33. Franzblau C., Gallop P. M., Seifter S., *Biopolymers* **1**, 79 (1963).
34. Franzblau C., Seifter S., Gallop P. M., *Biopolymers* **2**, 185 (1964).
35. Funakosi H., Noda H., *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 106 (1964).
36. Gallop P. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **54**, 486 (1955).
37. Gallop P. M., Seifter S., Meilman E., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 545 (1957).
38. Gallop P. M., Seifter S., Meilman E., *Nature* **183**, 1659 (1959).
39. Gallop P. M., *Biophys. J. (Suppl.)* **4**, 79 (1964).
40. Gallop P. M., *Nature* **209**, 73 (1966).
41. Garrett R. R., Flory P. J., *Nature* **177**, 176 (1956).

42. Glimcher M. J., Krane S. M., *Biochemistry* 3, 195 (1964).
43. Gordon H. A., Verzar F., *Gerontologia* 7, 85 (1963).
44. Grant N. H., Alburn H. E., *Arch. Biochem. Biophys.* 89, 262 (1960).
45. Grassmann W., Schleich H., *Biochem. Z.* 227, 320 (1935) cytowane za Harrington W. F., von Hippel P. H., *Adv Protein Chem.* 16, 1 (1961).
46. Grassmann W., Hormann H., Hafter R., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 307, 87 (1957).
47. Grassmann W., Hofmann U., Kuhn K., Hormann H., Endres H., Wolf K., *Connective Tissue*, red. Tunbridge R. E., Oxford 1957, str. 157.
48. Grassmann W., Nordwig A., Hormann H., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 323, 48 (1961).
49. Grassmann W., Hannig K., Engel J., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 324, 284 (1961).
50. Green N. M., Lowther D. A., *Biochem. J.* 71, 51 (1959).
51. Gross J., *Connective Tissue, Thrombosis and Atherosclerosis*, red. Page I. H., New York 1959, str. 77.
52. Gross J., Highberger J. H., Schmitt F. O., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 40, 679 (1954).
53. Gross J., Highberger J. H., Schmitt F. O., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 41, 1 (1955).
54. Gross J., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2, 261 (1956).
55. Gross J., *J. Exptl Med.* 107, 247 (1958).
56. Gross J., Durmsha B., Glazer N., *Biochim. Biophys. Acta* 30, 294 (1958).
57. Gross J., *J. Exptl Med.* 107, 265 (1958).
58. Gross J., Kirk D., *J. Biol. Chem.* 233, 355 (1958).
59. Gross J., Piez K. A., *Calcification in Biological Systems*, red. Sagnaes R. F., Washington 1960, str. 395.
60. Gross J., *Sci. Am.* May 121 (1961).
61. Gross J., *Comparative Biochemistry*, red. Florkin M., Mason H. S., New York 1963, str. 307.
62. Gross J., *Biophys. J. (Suppl.)* 4, 63 (1964).
63. Gustavson K. H., *Nature* 175, 70 (1955).
64. Gustavson K. H., *Connective Tissue*, red. Tunbridge R. E. Oxford 1957, str. 185.
65. Gustavson K. H., *Fed. Proc.* 23, 613 (1964).
66. Hafter R., Hormann H., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 330, 169 (1963).
67. Hall C. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 42, 801 (1956).
68. Hall C. E., Doty P., *J. Am. Chem. Soc.* 80, 1269 (1958).
69. Harkness R. D., Marko A. M., Muir H. M., Neuberger A., *Biochem. J.* 56, 558 (1954).
70. Harrington W. F., Von Hippel P. H., *Adv. Protein Chem.* 16, 1 (1961).
71. Heidrich H. G., Wynston L. K., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 342, 166 (1965).
72. Heyns K., Legler G., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 315, 288 (1959).
73. Heyns K., Legler G., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 321, 184 (1960).
74. Highberger J. H., *J. Am. Leather Chem. Assoc.* 56, 422 (1961).
75. Hodge J. A., Schmitt F. O., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 46, 186 (1960).
76. Hodge J. A., Highberger J. H., Deffner G. G. J., Schmitt F. O., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 46, 197 (1960).
77. Hormann H., Fries G., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 311, 19 (1958).

78. Hormann H., Joseph K. T., *Biochim. Biophys. Acta* **100**, 598 (1965).
79. Hormann H., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **341**, 284 (1965).
80. Houck J. C., Patel X. M., *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.* **116**, 382 (1964).
81. Jackson D. S., Fessler J. H., *Nature* **176**, 69 (1955).
82. Jackson D. S., Connective Tissue, red. Tunbridge R. E., Oxford 1957, str. 62.
83. Jackson D. S., Bentley J. P., *Biophys. Biochem. Cyt.* **7**, 37 (1960).
84. Juva K., Prockop D. J., *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 174 (1964).
85. Kajikawa K., Tanni T., Hirono R., *Acta Path. Japon.* **9**, 61 (1959), cytowane za Konno K., Tetsuka T., *J. Biochem.* **56**, 581 (1964).
86. Kang A. H., Nagai Y., Piez K. A., Gross J., *Biochemistry* **5**, 509 (1966).
87. Kazakowa O. V., Orekhovich V. N., Shipkiter V. O., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **122**, 557 (1958).
88. Konno K., Tetsuka T., *J. Biochem.* (Tokyo) **56**, 581 (1964).
89. Kretsinger R., Manner G., Gould B. S., Rich A., *Nature* **202**, 438 (1964).
90. Kuhn K., Grassmann W., Hofmann U., *Z. Naturforsch.* **14B**, 436 (1959).
91. Kuhn K., Kuhn J., Hanning K., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **326**, 50 (1961).
92. Kuhn K., Hanning K., Hormann H., *Leder* **12**, 237 (1961).
93. Kuhn K., Schuppler G., Kuhn J., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **338**, 10 (1964).
94. Lampert D. T. A., *J. Biol. Chem.* **238**, 1438 (1963).
95. Leach A. A., *Biochem. J.* **67**, 83 (1957).
96. Lewis M. S., Piez K. A., *J. Biol. Chem.* **239**, 3336 (1964).
97. Lewis M. S., Piez K. A., *Biochemistry* **3**, 1126 (1964).
98. Lindstedt S., Prockop D. J., *J. Biol. Chem.* **236**, 1399 (1961).
99. Lowther D. A., Green N.-M., Chapman J. A., *Biochem. Biophys. Cyt.* **10**, 373 (1961).
100. Manahan J., Mandl I., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 268 (1961).
101. Mandl I., *Adv. Enzymol.* **23**, 165 (1961).
102. Manner G., Gould B. S., *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 243 (1963).
103. Manning J. M., Meister A., *Biochemistry* **5**, 1154 (1966).
104. Mathews M. B., *Biochem. J.* **96**, 710 (1965).
105. Mazourov V. I., Orekhovich Y. N., *Biokhimija* **24**, 33 (1959).
106. Mazourov V. I., Orekhovich V. N., *Biokhimija* **25**, 814 (1960).
107. Mechanic G. L., Levy M., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 1889 (1959).
108. Melnik S. C., *Nature* **181**, 1483 (1958).
109. Michaels S., Gallop P. M., Seifter S., Meilman E., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 450 (1958).
110. Miller E. J., Martin G. R., Piez K. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 248 (1964).
111. Mitoma C., Smith T. E., Fridberg F., Rayford C., *J. Biol. Chem.* **234**, 78 (1959).
112. Nageotte J., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **96**, 172 (1927), cytowane za Harrington W. F., von Hippel P. H., *Adv. in Prot. Chem.* **16**, 1 (1961).
113. Neuberger A., Perrone J. C., Slach H. G. B., *Biochem. J.* **49**, 199 (1951).
114. Neuman R. E., *Arch. Biochem.* **24**, 289 (1949).
115. Nishihara T., Japanese Patent 9295/63 cytowane za Steven F. S., *Ann. Rheum. Dis.* **23**, 300 (1964).
116. Noda H., *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 92 (1955).
117. Nordwig A., Dick J. P., *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 176 (1965).

118. Olsen B. R., *Z. Zellforschung* **59**, 184 (1963).
119. Oneson L., Zacharias J., *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 271 (1961).
120. Orekhovich V. N., Tustanowskii A. A., Orekhovich K. D., Plotnikova N. E., *Biokhimiya* **13**, 55 (1948).
121. Orekhovich V. N., Shpikiter V. O., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **101**, 529 (1955).
122. Orekhovich V. N., Paulikhina L. V., Shpikiter V. O., *Biokhimiya* **22**, 210 (1957).
123. Orekhovich V. N., Shpikiter V. O., Kazakowa O., Mazurov V., *Arch. Biochem.* **85**, 554 (1959).
124. Orekhovich V. N., Shpikiter V. O., Mazurov V. I., Kunina O. V., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **42**, 505 (1960).
125. Peterkofsky B., Udenfriend S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 184 (1961).
126. Peterkofsky B., Udenfriend S., *Fed. Proc.* **21**, 169 (1962).
127. Peterkofsky B., Udenfriend S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **12**, 257 (1963).
128. Peterkofsky B., Udenfriend S., *J. Biol. Chem.* **238**, 3966 (1963).
129. Petruska J. A., Hodge A. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 871 (1964).
130. Piez K. A., Gross J., *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 24 (1959).
131. Piez K. A., Gross J., *J. Biol. Chem.* **235**, 995 (1960).
132. Piez K. A., Lewis M. S., Martin G. R., Gross J., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 596 (1961).
133. Piez K. A., Eigner E. A., Lewis M. S., *Biochemistry* **2**, 58 (1963).
134. Piez K. A., *J. Biol. Chem.* **239**, PC4315 (1964).
135. Piez K. A., *Biochemistry* **4**, 2590 (1965).
136. Porter K. R., Pappas G. D., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 143 (1959).
137. Prockop D., Kaplan A., Udenfriend S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 162 (1962).
138. Prockop D. J., Peterkofsky B., Udenfriend S., *J. Biol. Chem.* **237**, 391 (1962).
139. Prockop D. J., Juva K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 54 (1965).
140. Prockop D. J., Juva K., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 661 (1965).
141. Ramachandran G. M., Kartha G., *Nature* **174**, 269 (1954).
142. Rice R. V., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **46**, 1186 (1960).
143. Rice R. V., Casassa E., Kervin R., Maser M., *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 409 (1964).
144. Rich A., Crick F. H. C., Recent Advances in Glue Research, red. Stainsby G. New York 1958, str. 20, cyt. za Gross J., Comparative Biochemistry, red. Florkin M., Mason H. S., New York 1963, str. 307.
145. Rich A., Crick F. H. C., *Mol. Biol.* **3**, 483 (1961).
146. Rojkind M., Blumenfeld O. O., Gallop P. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 320 (1964).
147. Rojkind M., Barland P., Blumenfeld O. O., Gallop P. M., *Fed. Proc.* **24**, 366 (1965).
148. Rojkind M., Blumenfeld O. O., Gallop P. M., *J. Biol. Chem.* **241**, 1530 (1966).
149. Rosen H., Kessler A., Levenson S. M., *Arch. Biochem.* **90**, 167 (1960).
150. Rosmus J., Drake M. P., Deyl Z. Abstract Third FEBS Meeting, Warsaw 4-7 April (1966), str. 248.
151. Rubin A. L., Phahl D., Speakman P. T., Davison P. F., Schmitt F. O., *Science* **139**, 37 (1963).

152. Rubin A. L., Drake M. P., Davison P. F., Phahl D., Speakman P. T., Schmitt F. O., *Biochemistry* **4**, 181 (1965).
153. Schmitt F. O., *Proc. Am. Phil. Soc.* **100**, 476 (1956).
154. Schmitt F. O., *Biophysical Science — A study Program*, red. Oncley J. L., New York 1959, str. 349.
155. Schmitt F. O., Levine L., Drake M. P., Rubin A. L., Pfahl D., Davison P. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 493 (1964).
156. Schmitt F. O., *Fed. Proc.* **23**, 618 (1964).
157. Sinex F. M., Van Slyke D. D., Christman D. R., *J. Biol. Chem.* **234**, 918 (1959).
158. Sigleton L., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 67 (1957).
159. Stearm M. L., *Am. J. Anatomy* **66**, 133 (1940), cytowane za Konno K., Tetsuka T., *J. Biochemistry* **56**, 581 (1964).
160. Stetten M. R., Schoenheimer R., *J. Biol. Chem.* **153**, 113 (1944).
161. Steven F. S., Tristram G. R., *Biochem. J.* **83**, 240 (1962).
162. Steven F. S., *Ann. Rheum. Dis.* **23**, 300 (1964).
163. Steven F. S., *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 465 (1965).
164. Tristram G. R., *The Proteins I*, red. Neurath H., Bailey K., New York 1953, str. 181.
165. Udenfriend S., *Science* **152**, 1335 (1966).
166. Veis A., Cohen J., *Nature* **186**, 720 (1960).
167. Veis A., Schluter R. J., *Biochemistry* **3**, 1650 (1964).
168. Veis A., Anesey J., *J. Biol. Chem.* **240**, 3899 (1965).
169. Von Hippel P. H., Gallop P. M., Seifter S., Cunningham R. S., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 2774 (1960).
170. Waston M. R., *Biochem. J.* **68**, 416 (1958).
171. Waston M. R., Silvester N. R., *Biochem. J.* **71**, 578 (1959).
172. Ward A. G., *Discovery* **2**, 22 (1965).
173. Williams A. P., *Biochem. J.* **74**, 304 (1960).
174. Wood G. C., *Biochem. J.* **75**, 598 (1960).

Po oddaniu artykułu do druku ukazały się dalsze prace Bornsteina i wsp. wyjaśniające powstawanie wewnątrzcząsteczkowych międzylańcuchowych wiązań krzyżowych w kolagenie:

Biochemistry **5**, 3460, 3803 i 3813 (1966) oraz **6**, 788 (1967).

WOJCIECH ARDELT*

Molekularne uszkodzenia elastyny i kolagenu w lityryzmie i niektórych innych schorzeniach tkanki łącznej

The Molecular Alterations of Elastin and Collagen in Lathyrism and in Some Other Connective Tissue Diseases

The disturbances of maturation processes of collagen and elastin in lathyrism and in some connective tissue disorders in men, are reviewed. The actual hypotheses on the possible mechanism of action of lathyrogenic compounds are also discussed.

Podawanie rosnącym zwierzętom kręgowym niektórych roślin strączkowych, na przykład *Lathyrus odoratus*, lub też niektórych związków chemicznych, na przykład β -aminopropionitrylu, wywołuje szereg rozległych zmian na terenie tkanki łącznej. Schorzenie jest ciężkie, charakteryzuje się różnorodnymi objawami, z których najważniejsze są: deformacje szkieletowe oraz osłabienie takich tkanek lub struktur jak kości, ścięgna, wiązadła, skóra oraz ściany naczyń. Osłabienie ściany aorty prowadzi najczęściej do wytworzenia się tętniaka a w konsekwencji do śmierci zwierzęcia. Schorzenie to otrzymało nazwę: lityryzm, rzadziej używa się nazwy: osteolityryzm, wskazującej na kości jako na miejsce najbardziej widocznych uszkodzeń. Okazało się ono dogodnym modelem eksperymentalnym do badań biosyntezy, dojrzewania i biodegradacji poszczególnych składników tkanki łącznej, a zwłaszcza jej białek strukturalnych: kolagenu i elastyny. Należy podkreślić, że w schorzeniu tym powstają także uszkodzenia w obrębie tak zwanej substancji podstawowej, w której leżą włókna elastyczne i kolagenowe. Trzeba więc również brać pod uwagę zmiany w obrębie kwaśnych mukopolisacharydów, rozpuszczalnych białek, połączeń białkowo-cukrowcowych oraz białkowo-lipidowych (2, 43). Lityryzm jest przedmiotem kilku artykułów przeglądowych (2, 16, 19, 43, 44, 52). Ten artykuł omawia najnowsze osiągnięcia w badaniach na poziomie molekularnym, patogenety lityryzmu oraz niektórych chorób tkanki łącznej u ludzi.

* Mgr, st. asystent Zakładu Biochemii Instytutu Reumatologicznego, Warszawa.

I. Własności kolagenu z tkanek zwierząt latyrycznych

Objawy latyryzmu wskazywały na uszkodzenie zarówno kolagenu, który jest głównym budulcem organicznym kości, ścięgien i skóry jak i elastyny stanowiącej główne białko strukturalne wiązań i ścian naczyń oraz występującej w znacznej ilości w skórze. Te dwa białka znalazły się więc w centrum zainteresowania. Ze względu jednak na niewielkie zaawansowanie badań nad strukturą elastyny, brak było początkowo danych o zmianach tego białka w latyryzmie. Kolagen latyryczny wykazywał szereg niezmiennych własności, w porównaniu z prawidłowym kolagenem charakteryzuje się on jednak znacznie większą rozpuszczalnością (7, 14, 20) oraz mniejszą reaktywnością z 2,4-dwunitrofenylohydrazyną (18), co wskazywało na zmniejszoną zawartość grup aldehydowych. O ile w 1M oziębionym roztworze chlorku sodowego rozpuszcza się około 10% kolagenu tkanek prawidłowych, z tkanek latyrycznych można w tych warunkach wyekstrahować około 40% kolagenu kości i ściany aorty oraz nawet 60% kolagenu skóry (20). Na podstawie badań izotopowych przyjęto, że główną część, a być może całość nadwyżki rozpuszczalnego kolagenu w latyryzmie stanowi białko wytworzone po podaniu latyrogenu (46, 47).

Kolagen i elastyna są polimerami o dużym ciężarze cząsteczkowym. Ich makrocząsteczki składają się z wielu podstawowych podjednostek, których łańcuchy polipeptydowe spięte są ze sobą wiązaniami krzyżowymi różnych rodzajów. Synteza tropokolagenu stanowiącego podstawową podjednostkę kolagenu zachodzi wewnątrzkomórkowo, w fibroblacie. Następnie tropokolagen jest deponowany w przestrzeniach międzykomórkowych, gdzie ma miejsce tworzenie się włókien i dojrzewanie kolagenu. Podobny schemat biosyntezy, fibrogenezy i dojrzewania proponuje się również dla elastyny, lecz w odróżnieniu od kolagenu, jej rozpuszczalny prekursor nie jest dobrze poznany.

Biosynteza kolagenu w tkankach latyrycznych zachodzi z prawidłową szybkością i prowadzi do powstawania monomeru, o którym na podstawie wszystkich badanych własności można powiedzieć, że jest prawidłowy (8, 20). Natomiast w procesie fibrogenezy *in vivo* powstają w latyryzmie włókna nieco cieńsze od prawidłowych (12), a tworzenie włókien *in vitro* z rozpuszczonego kolagenu jest nieco opóźnione (27). Te dosyć subtelne zmiany wraz ze zwiększoną rozpuszczalnością kolagenu w latyryzmie stały się punktem wyjścia hipotezy, że w schorzeniu tym zachodzi uszkodzenie pozakomórkowej agregacji kolagenu.

II. Charakter uszkodzeń molekularnych w latyryzmie i mechanizm działania związków latyrogennych

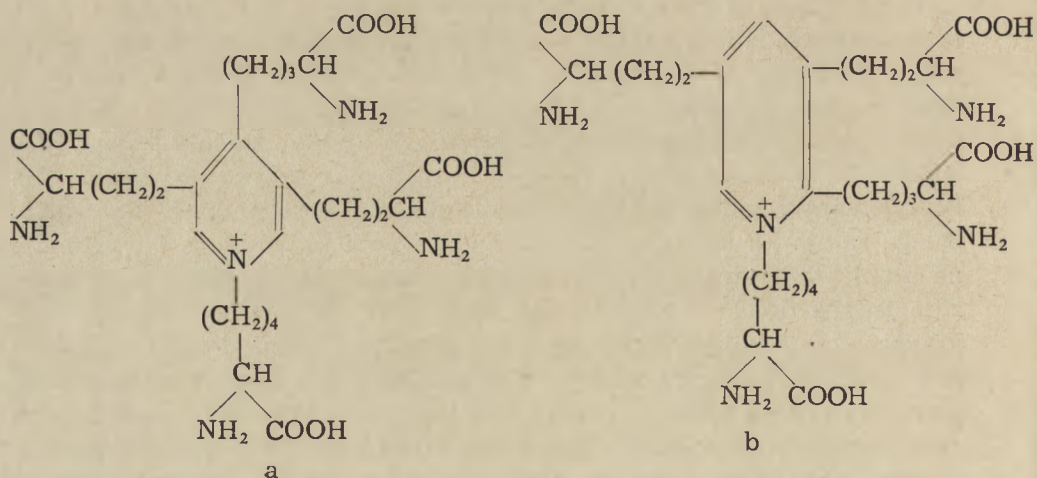
W obojętnych roztworach soli rozpuszcza się około 1% kolagenu z tkanek prawidłowych. Rozpuszczalny w tych warunkach kolagen reprezentuje najmłodsze, świeżo wytworzone białko. Dalszy 1% kolagenu reprezentujący „starsze” białko można wyekstrahować z tkanek za pomocą kwaśnych roztworów, na przykład buforu cytrynianowego i rozcieńczonego kwasu octowego. Około 98% kolagenu prawidłowego pozostaje więc nierozpuszczalne w warunkach prostej ekstrakcji (15, 39).

Tropokolagen zawiera trzy łańcuchy polipeptydowe, przy czym w świeżo wytworzonym białku połączone są one jedynie wiązaniami wodorowymi oraz, być może, na drodze oddziaływań hydrofobowych. Jeżeli obojętny roztwór kolagenu ogrzewa się po zakwaszeniu do pH 5 lub też działa się nań mocznikiem czy innymi czynnikami eliminującymi wiązania wodorowe i oddziaływania hydrofobowe, to cząsteczka tropokolagenu rozpada się na składowe łańcuchy α , które można oddzielić od siebie drogą chromatografii na karboksymetylocelulozie (39, 41). Podczas dojrzewania kolagenu wytwarzają się mocne, kowalentne wiązania krzyżowe. Jeżeli łączą one dwa łańcuchy, to po denaturacji otrzymuje się z jednej cząsteczki tropokolagenu, jeden fragment dwułańcuchowy (komponenta β) i jeden jednołańcuchowy (komponenta α). Połączenie trzech łańcuchów prowadzi do powstania trwałego, nie rozpadającego się podczas denaturacji trimery (komponenta γ , γ -tropokolagen). Dalszy proces prowadzi do powstania wiązań krzyżowych między łańcuchami sąsiadujących ze sobą cząsteczek tropokolagenu, a w konsekwencji do powstawania trwałej trójwymiarowej siatki przestrzennej polimeru (kolagen nierozpuszczalny). W kwaśnym ekstrakcie z tkanek prawidłowych, zawierającym, jak już wspomniano, starsze białko, występuje obok komponent α również pewna ilość komponent β oraz mniejsza ilość trimerów γ . Kwaśny ekstrakt z tkanek latyrycznych zawiera natomiast niemal wyłącznie komponenty α i ślady komponenty β , jest więc zbliżony składem do obojętnego ekstraktu tkanek prawidłowych (21, 26). Postulowany błąd w agregacji molekularnej kolagenu w latyryzmie polega zatem na uszkodzeniu procesu wiązania krzyżowego i występuje na etapie dojrzewania tego białka (21). Stwierdzenie takie nie precyzuje jednak defektu molekularnego jeżeli nie określi się natury wiązań krzyżowych w kolagenie. Spośród wielu hipotez o charakterze tych wiązań dwie zasługują na większą uwagę: teoria transestryfikacji podana przez Gallopa i wsp. (13) oraz koncepcja interakcji dwu zmienionych reszt lizyny sformułowana przez Bornsteina i wsp. (4). Według pierwszej hipotezy każdy z trzech łańcuchów polipeptydowych tropokolagenu składa się z czterech podjednostek połączonych trzema parami wiązań estrowych. W wiązaniach tych biorą udział hydroksylowe grupy

niezidentyfikowanej heksozy, związanej z białkiem wiązaniem glikozydowym przez hydroksylową grupę tyrozyny oraz karboksylowe grupy dwu reszt kwasu asparaginowego. Wiązania w parach nie są równocenne, gdyż jedno z nich tworzone jest przez α , a drugie przez β -karboksylową grupę kwasu asparaginowego. Jedno z nich jest bardziej reaktywne i zdolne do transestryfikacji z sąsiednim łańcuchem tej samej albo sąsiedniej cząsteczki tropokolagenu. Proces postępuje w czasie i prowadzi do powstania trwałego kolagenu o maksymalnej ilości wiązań krzyżowych. Druga hipoteza znalazła liczniejszych zwolenników. Ze względu na podobieństwa biosyntezy i zbliżoną strukturę postulowanego wiązania krzyżowego w kolagenie do wiązań w elastynie, zostanie ona szczegółowo omówiona w dalszej części artykułu.

Dalszy rozwój badań nad patogenezą łatyryzmu przebiegał równolegle do postępu wiedzy o strukturze drugiego włókiennkowego białka tkanki łącznej — elastyny. Badając naturę wiązań krzyżowych w elastynie wyodrębniono z niej za pomocą kolejnego działania kilkoma enzymami proteolitycznymi frakcję peptydów zbudowanych z dwu lub więcej krótkich łańcuchów, a więc zawierających wiązania krzyżowe. Z kwaśnych hydrolizatów tych peptydów wyodrębniono następnie dwie ninhydrynopozytywne substancje, różne od znanych aminokwasów (35). Okazało się, że są to izomeryczne poliaminokwasy zawierające cztery wolne grupy aminowe i cztery wolne grupy karboksylowe oraz czwartorzędowy pierścień pirydynowy (53). Otrzymały one nazwy: desmozyna i izodesmozyna. Ich budowę (38) przedstawia rysunek 1.

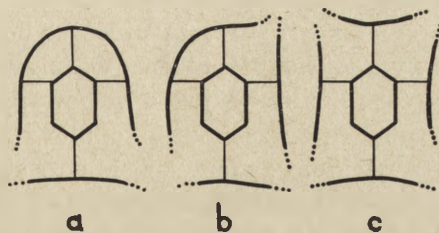
Wysunięto hipotezę, że desmozyna i izodesmozyna stanowią wiązania krzyżowe w elastynie — ich wolne grupy aminowe i karboksylowe



Rys. 1. Struktura desmozyny (a) i izodesmozyny (b) według (38)

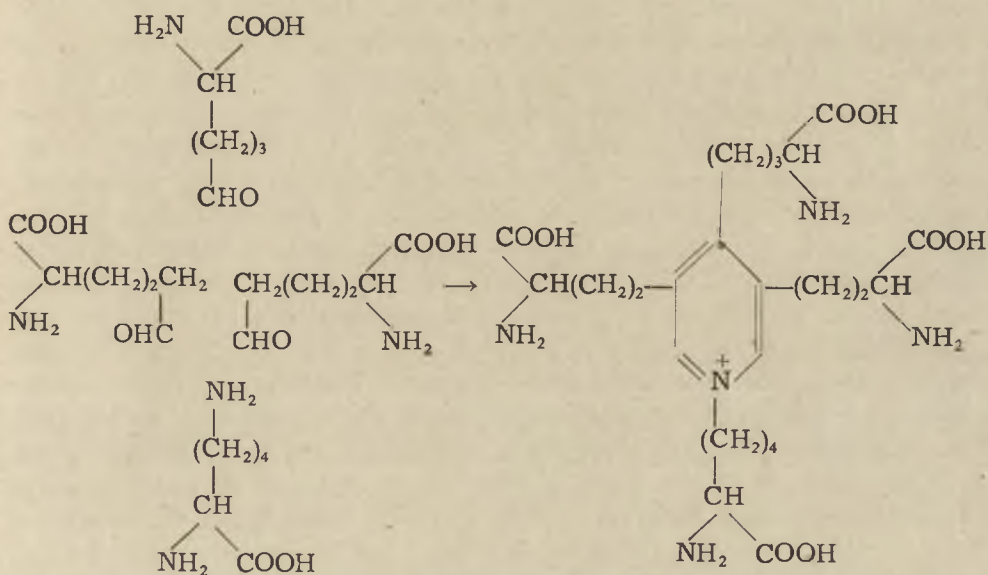
są zaangażowane w wiązaniach peptydowych dwu, trzech, a nawet czterech łańcuchów (36, 53) (rysunek 2).

Zarówno desmozyna jak i izodesmozyna zawierają dwadzieścia cztery atomy węgla, a struktura ich wskazuje, że mogą one powstawać w re-



Rys. 2. Schemat wiązania przez desmozynę dwu (a), trzech (b) i czterech (c) łańcuchów polipeptydowych elastyny (1)

akcji czterech reszt sześciowęglowego aminokwasu — lizyny. Biosynteza taka musiałaby przebiegać z odszczepieniem trzech części amoniaku (37).



Rys. 3. Powstawanie desmozyny z trzech reszt semialdehydu kwasu α-aminoadypinowego oraz jednej reszty lizyny (37, 38)

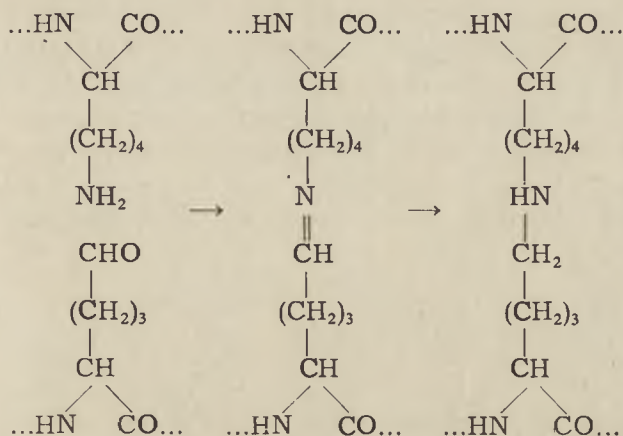
W pierwszym etapie biosyntezy dochodziłoby do oksydacyjnej dezaminacji trzech spośród czterech reszt lizyny związanych peptydowo z różnymi łańcuchami. Proces ten prowadzi do powstania δ-semialdehydu kwasu α-aminoadypinowego, którego trzy cząsteczki tworzyłyby następnie z jedną niezmienną resztą lizyny pierścień pirydynowy desmozyny (rysunek 3). Słuszność tego schematu potwierdziły badania izoto-

powe, w których wykazano, że jedynym aminokwasem wbudowującym się *in vivo* i *in vitro* do desmozyn jest lizyna (1, 23, 36, 38). Wykazano ponadto, że jeżeli z elastyny, napiętnowanej w warunkach hodowli tkankowej ściany aorty ^{14}C -lizyną, wyodrębni się desmozynę i podda ją działaniu 10 N NaOH (zniszczenie pierścienia pirydynowego), to radioaktywność odzyskanej lizyny stanowi czwartą część radioaktywności desmozyny (1). Tak więc wydaje się nie ulegać wątpliwości, że desmozyny powstają z czterech reszt lizyny w już uformowanych łańcuchach polipeptydowych elastyny. Proces zachodzi stopniowo, ilość wiązań krzyżowych zwiększa się z wiekiem zwierzęcia. Ma to swoje odbicie w wynikach badań składu aminokwasowego elastyny pochodzącej od zwierząt w różnym wieku. Ilość desmozyn rośnie wraz z wiekiem, zaś ilość lizyny proporcjonalnie się obniża. Dokładny mechanizm biosyntezy desmozyn nie jest poznany, prawdopodobnie jednak conajmniej etap oksydacyjnej dezaminacji lizyny jest procesem enzymatycznym.

Nowe informacje w zakresie patogenezy latyryzmu uzyskano z dość nieoczekiwanego źródła. Wiadomo było, że u zwierząt kręgowych pozostających na diecie ubogiej w miedź, dochodzi do powstawania tętniaka aorty (28, 45), a więc jednego z objawów latyryzmu. Okazało się, że elastyna z aort zwierząt utrzymywanych na diecie bezmiedziowej zawiera znacznie więcej lizyny (48, 55) oraz mniej desmozyn (30) i grup karbonylowych (25) niż prawidłowa. Podobne zmiany znaleziono w elastynie z aort zwierząt latyrycznych (24). Stało się więc oczywiste, że zarówno w latyryzmie jak i w niedoborze miedzi, występuje zahamowanie przekształcania się lizyny w desmozyny, a więc zahamowanie procesu wiązania krzyżowego. Zostało to potwierdzone w badaniach izotopowych zarówno *in vivo* (24, 29, 30), jak i *in vitro*, w hodowli tkankowej ściany aorty (30). Wysunięto hipotezę, że proces oksydacyjnej dezaminacji lizyny prowadzący do powstawania jej pochodnej aldehydowej, pośredniczącej w biosyntezie wiązania krzyżowego, jest katalizowany przez enzym lub też układ enzymatyczny wymagający miedzi (30).

Okazało się, że interakcja reszt zmienionej lizyny w sąsiadujących ze sobą łańcuchach polipeptydowych elastyny może zakończyć się na etapie kondensacji dwu cząsteczek. Z fragmentów bogatych w wiązania krzyżowe wyizolowano bowiem jeszcze jeden nieznany dotąd aminokwas, a mianowicie *N*-(5-amino-5-karboksypentanylo)-lizynę, czyli lizynonorleucynę (10, 11, 17). Powstaje ona z jednej reszty niezmienionej lizyny oraz z jednej reszty δ -semialdehydu kwasu α -aminoadypinowego. Produktem pośrednim jest zasada Schiffa — 6,7-dehydrolizynonorleucyna, która łatwo ulega redukcji do lizynonorleucyny (rysunek 4).

Tworzenie się takiego wiązania zależne byłoby od aktywności postulowanego układu enzymatycznego, katalizującego oksydacyjną przemianę lizyny i powinno być również blokowane w latyryzmie oraz niedoborze miedzi.



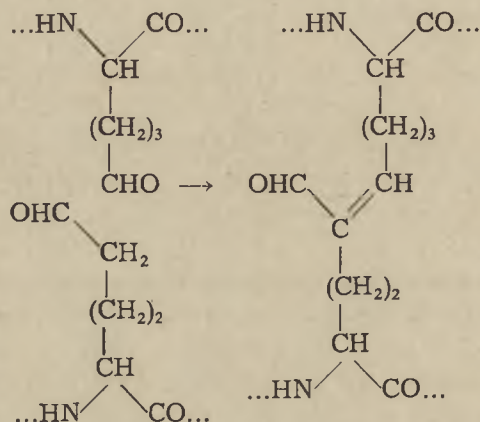
Rys. 4. Tworzenie się lizynonorleucyny (11)
Objaśnienia w tekście.

W latyryzmie zachodzi upośledzenie biosyntezy wiązań krzyżowych również w kolagenie. W białku tym wykazano obecność wiązania powstającego w reakcji dwu reszt zmienionej lizyny leżących w sąsiedujących ze sobą łańcuchach tropokolagenu (4, 5, 6, 42). Podczas dojrzewania kolagenu zachodzi oksydacyjna dezaminacja reszty lizyny zajmującej piątą pozycję licząc od aminowego końca α -łańcucha. Prowadzi to podobnie jak w elastynie, do powstawania w tym miejscu δ -semialdehydu kwasu α -aminoadypinowego. Dwie reszty aldehydu, znajdujące się w sąsiadujących łańcuchach cząsteczki reagują ze sobą tworząc wiązanie krzyżowe. Dokładna struktura tego wiązania nie została dotąd ustalona. Ponieważ jednak dwułańcuchowe peptydy otrzymane z kolagenu oddziałują jako nienasycone aldehydy, postuluje się, że wiązania krzyżowe powstają na drodze kondensacji aldolowej dwu reszt aldehydu. Proces kondensacji aldolowej przebiega bowiem z zachowaniem grupy aldehydowej jednego z dwu reagujących aldehydów w stanie niepodstawionym. Jeżeli hipoteza ta jest słuszna to powstawanie wiązania krzyżowego w kolagenie mogłoby przebiegać jak na rysunku 5.

Kondensacja reszt aldehydowej pochodnej lizyny nie wyjaśnia jednak tworzenia się związanego krzyżowo trimeru (γ -tropokolagenu), jeśli bowiem tylko jedna reszta lizyny w łańcuchu α ulega przekształceniu w odpowiedni aldehyd, to jeden łańcuch mógłby tworzyć tylko jedno wiązanie krzyżowe. Postulowano więc możliwość kondensacji trójmolekularnej (5). Prawdopodobnie w kolagenie jak również w elastynie mogą występować także inne typy wiązań krzyżowych. Selektywna dezaminacja jednej tylko reszty lizyny w pozycji piątej łańcucha α możliwa jest dzięki temu, że N-końcowy fragment cząsteczki tropokolagenu pozbawiony jest struktury drugorzędowej. Przypuszcza się, że w dalszej części cząsteczki, objętej strukturą spiętrzonego heliksu, istnieją prze-

strzenne przeszkody dla oksydacyjnej dezaminacji i reszty lizyny leżące w tym obszarze nie ulegają przekształceniu (5). Wykazano równocześnie, że w latyryzmie przekształcanie się lizyny w odpowiedni aldehyd nie zachodzi lub jest w znacznym stopniu zahamowane (5, 42).

W kolagenie istnieje zatem conajmniej jeden typ wiązania krzyżowego, którego biosynteza obejmuje oksydacyjną przemianę lizyny, a w elastynie conajmniej dwa typy takich wiązań krzyżowych. W kola-



Rys. 5. Hipotetyczny schemat powstawania i struktury wiązania krzyżowego w kolagenie

genie dochodzi do kondensacji dwu reszt zmienionej lizyny, w elastynie występuje interakcja dwu lub czterech reszt tego związku. Ponieważ w latyryzmie oksydacyjna dezaminacja lizyny jest upośledzona, powstawanie wszystkich wymienionych wyżej typów wiązań krzyżowych jest w tym schorzeniu hamowane.

Jedną z pierwszych koncepcji mechanizmu działania latyrogenów była hipoteza Levene'a (18), według której związki te reagując z ugrupowaniami aldehydowymi łańcuchów kolagenu niezbędnymi do tworzenia się wiązań krzyżowych, blokowałyby proces wiązania łańcuchów. Hipoteza ta wprawdzie dobrze tłumaczyła niższą zawartość aldehydów w kolagenie latyrycznym, jednak przeciw niej przemawia zbyt małe wbudowywanie się znakowanych latyrogenów do kolagenu (31). O wiele bardziej prawdopodobna jest koncepcja działania latyrogenów poprzez hamowanie enzymu lub układu enzymatycznego katalizującego przejście: lizyna $\rightarrow$ δ -semialdehyd kwasu α -aminoadypinowego (5, 32). Taka koncepcja tłumaczyłaby również obniżoną ilość grup aldehydowych w kolagenie latyrycznym, a także hamowanie przez latyrogeny oksydazy aminowej z osocza bydłęcego (51, 57) i świni (33) oraz oksydazy monoaminowej osocza ludzkiego (22), a więc enzymów katalizujących zbliżoną reakcję. Oksydaza aminowa z osocza świni jest hamowana przez

β -aminopropionitryl kompetycyjnie i odwracalnie. Przez analogię postuluje się, że latyrogeny, które wszystkie zawierają wolną grupę aminową, mogą hamować kompetycyjnie układ enzymatyczny katalizujący oksydacyjną przemianę lizyny (33).

Na podstawie porównawczych badań elastyny w latyryzmie i niedoborze miedzi, można przypuszczać, że układ ten wymaga miedzi (30). Należy podkreślić, że wszystkie przytoczone oksydazy są miedzioenzymami. Wiadomo również, że w cząsteczkach wszystkich znanych latyrogenów występują dwa atomy azotu z wolną parą elektronów, co nadaje tym związkom własności chelatujące. Należy więc brać także pod uwagę możliwość, że mechanizm działania latyrogenów może polegać na chelatowaniu miedzi co eliminowałoby ten kation z ustroju lub też uniemożliwiałoby jego działanie jako koenzymu w układzie oksydacyjnej przemiany lizyny.

III. Latyryzm a choroby tkanki łącznej u ludzi

Chociaż latyryzm nie jest w całości odpowiednikiem żadnego ze stanów patologicznych u ludzi*, to jednak poszczególne objawy tego schorzenia można odnaleźć w niektórych znanych chorobach tkanki łącznej. Podobieństwo, a nawet identyczność objawów makroskopowych nie musi być jednak wyrazem identyczności uszkodzeń molekularnych, a tym więcej mechanizmów ich powstawania. I odwrotnie, występowanie tego samego uszkodzenia na poziomie molekularnym w dwu różnych stanach patologicznych, zwłaszcza gdy występuje ono obok szeregu innych uszkodzeń, nie musi manifestować się identycznymi objawami makroskopowymi.

Pamiętając o tych zastrzeżeniach, warto jednak porównać objawy latyryzmu z objawami niektórych schorzeń tkanki łącznej u ludzi. Latyryzm jest bowiem eksperymentalnym modelem molekularnego schorzenia tkanki łącznej, w którym charakter zmian jest dość dobrze poznany, natomiast znajomość uszkodzeń na poziomie molekularnym w chorobach tej tkanki u ludzi jest znikoma, co jest wynikiem przede wszystkim ograniczonych możliwości eksperymentowania. W tablicy 1 zestawiono objawy latyryzmu wraz z odpowiadającymi im objawami kilku znanych chorób tkanki łącznej.

Jak widać z tablicy, o większej zbieżności z objawami latyryzmu można mówić tylko w przypadku zespołu Ehlersa-Danlosa. Jednak badania składu aminokwasowego elastyny izolowanej *post mortem* ze skóry pacjentów z tym schorzeniem nie wykazują nieprawidłowości w poziomie

* U ludzi opisano schorzenie układu nerwowego (neulatyryzm), wytwarzające się w wyniku spożywania znacznych ilości pewnych roślin strączkowych, innych jednak niż rośliny wywołujące uszkodzenia tkanki łącznej.

T a b l i c a 1

Zestawienie głównych objawów latryzmu oraz odpowiadających im objawów niektórych chorób tkanki łącznej u ludzi

Objawy	Schorzenie						
	Latryzm	Zespół Marfana	Zespół Ehlersa-Danlosa	<i>Pseudoxantoma elasticum</i>	<i>Osteogenesis imperfecta</i>	Zespół Hurlera	G.P.P.* i Z.Z.S.K.
Deformacje szkieletowe	+	+	+		+	+	+
Oslabienie wiązadeł i ścięgien	+	+	+			+	?
Łamliwość kości	+						
Zaburzenia wzrostu							
kości i chrząstek							
Zwyrodnieniowe zmiany w stawach	+		?				
Cienkość ścian naczyń i tętniak aorty	+	+	+	+		+	
Przepukliny	+		+				
Zwiększona rozciągliwość skóry	+		+			+	
Oslabiona wytrzymałość skóry na rozrywanie	+		+	+	+		

* G.P.P. — gościec przewlekły postępujący, Z.Z.S.K. — zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa.

desmoczyn ani też lizyny (54). Powstawanie zatem conajmniej jednego typu wiązań krzyżowych jest nieuszkodzone. Postuluje się, że w schorzeniu tym zmianie ulega kolagen, który stanowi główny składnik strukturalny skóry (70%), torebek stawowych i powięzi. Brak jednak przejrzystych wyników doświadczalnych, które mogłyby wyjaśnić charakter uszkodzenia.

Nie ma bliskiej zbieżności objawów latyryzmu i schorzeń gośćcowych (tablica 1). Niemniej szereg wyników wskazuje w gościecu przewlekłym postępującym na uszkodzenie conajmniej w obrębie kolagenu. Wykazano bowiem, że kolagen izolowany z tkanek stawowych otrzymywanych w czasie zabiegów chirurgicznych od pacjentów z tym schorzeniem, jest bardziej wrażliwy na trawienie pronazą niż kolagen otrzymany *post mortem* z tkanek stawowych ludzi, u których wykluczono choroby tkanki łącznej (49). Jeżeli nierozpuszczalny kolagen gośćcowy poddaje się przedłużonemu działaniu 2 N NaOH w temperaturze 4°, a następnie gotowaniu w pH 7, to do roztworu przechodzi blisko 90% białka, podczas gdy kolagen ze stawów prawidłowych rozpuszcza się w tych warunkach w około 30% (50). Zarówno trawienie pronazą jak i działanie ługu w opisanych wyżej warunkach prowadzą do niezbadanego dokładnie uszkodzenia cząsteczki kolagenu w obszarach uformowanych już wiązań krzyżowych. Tak więc obserwowane różnice między kolagenem prawidłowym a gośćcowym mogą wskazywać na defekt tych wiązań w gościecu przewlekłym postępującym. Autor opisanych wyżej doświadczeń rozróżnia conajmniej dwa rodzaje wiązań krzyżowych w prawidłowym kolagenie (50). Jeden typ wiązania jest niszczone przez hydroksyloaminę, a więc mogą to być wiązania estrowe, jak w omówionej już hipotezie Gallopa i wsp. (13), drugi typ ulega działaniu oziębionego ługu (trudno ocenić w jakim stosunku pozostaje ta hipoteza do koncepcji kondensacji aldolowej Bornsteina i wsp. (4)). W gościecu przewlekłym postępującym zachodzić ma uszkodzenie wiązań opornych na działanie ługu. Możliwe, że w schorzeniu tym podobnie jak w latyryzmie zachodzi uszkodzenie wiązania łańcuchów polipeptydowych kolagenu, nie wiadomo jednak czy uszkodzony jest ten sam rodzaj wiązań. Należy podkreślić, że istnieją doświadczalne przesłanki defektu metabolizmu miedzi w gościecu przewlekłym postępującym. Nie wiadomo czy w gościecu zahamowane jest wytwarzanie się wiązań krzyżowych, czy też zniszczeniu ulegają uformowane już wiązania. Kolagen może bowiem ulegać uszkodzeniom w warunkach aktywacji procesów litycznych, która ma miejsce w stanach zapalnych (50). Znany jest fakt degradacji kolagenu przez enzymy lizosomalne (9) oraz destabilizacji lizosomów w chorobach tkanki łącznej (56). O aktywacji enzymów proteolitycznych w tym schorzeniu a także w zeszywniającym zapaleniu stawów kręgosłupa, można ponadto wnioskować ze zwiększonej w obu chorobach aktywności surowiczych inhibitorów kilku enzymów proteolitycznych (3). Aktywacja enzymów proteolitycznych

mogłyby być przyczyną uszkodzania wiązań krzyżowych w kolagenie. Brak jest jakichkolwiek danych o elastynie w chorobach gośćcowych.

Jak już wspomniano, badania na poziomie molekularnym białek strukturalnych tkanki łącznej w chorobach tej tkanki u ludzi są słabo zaawansowane. Badania zmian elastyny i kolagenu na zwierzęcym modelu molekularnej choroby tkanki łącznej mogą inspirować kierunki takich badań na materiale ludzkim.

LITERATURA

1. Anwar R. A., Oda G., *J. Biol. Chem.* **241**, 4638 (1966).
2. Ardel't W., *Post. Biochem.* **11**, 413 (1965).
3. Ardel't W., Księżny S., Niedźwiecka-Namysłowska I., Budzyński A. Z., *Ann. Rheum. Dis.* **25**, 450 (1966).
4. Bornstein P., Kang A., Piez K. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 417 (1966).
5. Bornstein P., Piez K. A., *Biochemistry* **5**, 3460 (1966).
6. Bornstein P., Kang A. H., Piez K. A., *Biochemistry* **5**, 3803 (1966).
7. Clemmons J. J., *Fed. Proc.* **17**, 432 (1958).
8. Dasler W., Stoner R. E., Milliser R. V., *Metabolism* **10**, 883 (1961).
9. Frankland D. M., Wynn C. H., *Biochem. J.* **85**, 276 (1962).
10. Franzblau C., Sinex F. M., Faris B., *Nature* **205**, 802 (1965).
11. Franzblau C., Sinex F. M., Faris B., Lampidis R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 575 (1965).
12. Fry P., Harkness M. L. R., Harkness R. D., Nightingale M., *J. Physiol.* **164**, 77 (1962).
13. Gallop P. M., *Biophys. J.* **4**, suppl. 1, 79 (1964).
14. Gross J., Levene C. I., *Am. J. Pathol.* **35**, 687 (1959).
15. Higgs D. G., Reed R., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 265 (1963).
16. Kulonen E., Juva K., Mikkonen L., Nikkari T., Salmi A., Tuominen T., *Biochem. Pharmacol.* **6**, 56 (1961).
17. Lent R., Franzblau C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **26**, 43 (1967).
18. Levene C. I., *J. Exptl Med.* **116**, 119 (1963).
19. Levene C. I., *Fed. Proc.* **22**, 1386 (1963).
20. Levene C. I., Gross J., *J. Exptl Med.* **110**, 771 (1959).
21. Martin G. R., Gross J., Piez K. A., Lewis M. S., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 599 (1961).
22. Mc Ewen C. M., Jr., *J. Biol. Chem.* **240**, 2003 (1965).
23. Miller E. J., Martin G. R., Piez K. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 248 (1964).
24. Miller E. J., Martin G. R., Mecca C. E., Piez K. A., *J. Biol. Chem.* **240**, 3623 (1965).
25. Miller E. J., Fullmer H. M., *J. Exptl Med.* **123**, 1097 (1966).
26. Nikkari T., Kulonen E., *Biochem. Pharmacol.* **11**, 931 (1962).
27. Nikkari T., Kulonen E., *Biochem. Pharmacol.* **13**, 89 (1964).
28. O'Dell B. L., Hardwick B. C., Reynolds G., Savage J. E., *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.* **108**, 402 (1961).
29. O'Dell B. L., Elsdon D. F., Thomas J., Partridge S. M., Smith R. H., Palmer R., *Biochem. J.* **96**, 35P (1965).

30. O'Dell B. L., Elsdon D. F., Thomas J., Partridge S. M., Smith R. H., Palmer R., *Nature* **209**, 401 (1966).
31. Orlof S. D., Gross J., *J. Exptl Med.* **117**, 1009 (1963).
32. Page R. C., Benditt E. P., *Lab. Invest.* **15**, 1643 (1966).
33. Page R. C., Benditt R. P., *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.* **124**, 454 (1967).
34. Page R. C., Benditt E. P., *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.* **124**, 459 (1967).
35. Partridge S. M., Elsdon D. F., Thomas, J., *Nature* **197**, 1297 (1963).
36. Partridge S. M., Elsdon D. F., Thomas J., Dorfman A., Tesler A., Ho P-L., *Biochem. J.* **93**, 30C (1964).
37. Partridge S. M., *J. Leather Trades Chemists* **49**, 41 (1965).
38. Partridge S. M., Elsdon D. F., Thomas J., Dorfman A., Tesler A., Ho P-L., *Nature* **209**, 399 (1966).
39. Piez K. A., Weiss E., Lewis M. S., *J. Biol. Chem.* **235**, 1987 (1960).
40. Piez K. A., Lewis M. S., Martin G. R., Gross J., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 596 (1961).
41. Piez K. A., Eigner E. A., Lewis M. S., *Biochemistry* **2**, 58 (1963).
42. Piez K. A., Martin G. R., Kang A. H., Bornstein P., *Biochemistry* **5**, 3813 (1966).
43. Rosmus J., Trnavsky K., Deyl Z., *Biochem. Pharmacol.* **15**, 1405 (1966).
44. Selye H., *Revue Can. Biol.* **16**, 1 (1957).
45. Shields G. S., Coulson W. F., Kimball D. A., Carnes W. H., Cartwright G. E., Wintrobe M. M., *Am. J. Pathol.* **41**, 603 (1962).
46. Smiley J. D., Yeager H., Ziff M., *J. Exptl Med.* **116**, 45 (1962).
47. Smith D. J., Shuster R. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 498 (1962).
48. Starcher B., Hill C. H., Matrone G., *J. Nutrit.* **82**, 318 (1964).
49. Steven F. S., *Ann. Rheum. Dis.* **24**, 473 (1965).
50. Steven F. S., *Ann. Rheum. Dis.* **25**, 563 (1966).
51. Tabor C. W., Tabor H., Rosenthal S. M., *J. Biol. Chem.* **208**, 645 (1954).
52. Tanzer M. L., *Internatl. Rev. Connective Tissue Research*, Academic Press, New York 1965, tom. 3, str. 91.
53. Thomas J., Elsdon D. F., Partridge S. M., *Nature* **200**, 651 (1963).
54. Varadi D. P., Hall D. A., *Nature* **208**, 1224 (1965).
55. Weissman N., Shields G. S., Carnes W. H., *J. Biol. Chem.* **238**, 3115 (1963).
56. Weissman G., *Lancet* **26**, 1373 (1964).
57. Yamada H., Yasunobu K. T., *J. Biol. Chem.* **238**, 2669 (1963).

DARIUSZ KRUZE*

Występowanie hydroksyproliny w organizmach ssaków i jej wydalanie w moczu

The Occurrence of Hydroxyproline in Mammalian Organisms and its Excretion in Urine

The occurrence of hydroxyproline and its excretion to urine is discussed in relation to collagen metabolism. The diagnostic importance of peptide-hydroxyproline determination in urine in various physiological and pathological conditions is reviewed.

I. Hydroksyprolina w kolagenie

Hydroksyprolina występuje tylko w dwóch białkach zwierzęcych: w kolagenie i elastynie. W kolagenie stanowi ona 13,5% wszystkich aminokwasów (65), natomiast w elastynie tylko około 2% (91), a nawet, według nowszych doniesień, nie przekracza 1,5% (71). Ponieważ kolagen stanowi 20—25% (64) wszystkich białek ssaków zwrócono uwagę na wydalanie do moczu wolnej, a przede wszystkim związanej peptydowo hydroksyproliny, wychodząc z założenia, że poziom połączeń hydroksyprolinowych w moczu może zależeć od metabolicznych procesów zachodzących w kolagenie tkankowym.

Kolagen u osobników dorosłych uważany był za metabolicznie bierny (62), okazało się jednak (80), że ulega on odnowie z niewielką szybkością, różną dla poszczególnych tkanek. Kolagen ścięgien można praktycznie uznać za całkowicie bierny, kolagen mięśni ma okres półtrwania 50—60 dni, a wątroby i jelit — 20—30 dni. Gerber i wsp. (22) donoszą o występowaniu w kościach frakcji kolagenu, która jest szybko wymieniana. Kao i wsp. (40) stwierdzili u szczura najszybszą odnowę kolagenu w macicy bezpośrednio po porodzie i prawie całkowitą bierność kolagenu ściany aorty oraz ścięgien ogona.

Orekwicz i wsp. (68, 69) przeprowadzili badania porównawcze nad kolagenem u kilku gatunków zwierząt, a co ważniejsze, śledzili jego odnowę u zwierząt jednego gatunku w różnym wieku i okresie wzrostu.

* Dr med., mgr chemii, adiunkt I Kliniki Chorób Wewnętrznych 2 Centralnego Szpitala Klinicznego Wojskowej Akademii Medycznej, Warszawa

Stwierdzili oni, że rozpuszczalny kolagen, nazwany przez nich prokolagenem, jest prekursorem nierozpuszczalnego kolagenu dominującego w strukturze tkankowej oraz, że zawartość prokolagenu zmienia się od około 18% kolagenu całkowitego u bardzo młodych zwierząt do około 1% u osobników starych.

Równoległe z badaniami nad metabolizmem kolagenu były prowadzone prace nad właściwościami fizykochemicznymi tego białka.

Już w roku 1900 Zachariades (98) stwierdził, że pewne frakcje kolagenu ścięgien ogona szczura rozpuszczają się w rozcieńczonych roztworach kwasów. Faktem tym zainteresowano się ponownie dopiero gdy Nageotte (61) wykazał, że niektóre kolageny rozpuszczalne w słabo kwaśnych roztworach można powtórnie przeprowadzić w postaci włókien stosując odpowiednie warunki dializy. Wielu badaczy doniosło o rozpuszczalności kolagenu różnych tkanek w rozcieńczonych kwasach (18, 20, 69), a także w obojętnych roztworach soli (21, 26, 34).

Schmitt i wsp. (84) na podstawie wyników uzyskanych przy użyciu mikroskopu elektronowego wysunęli hipotezę, że kolagen jest zbudowany z podstawowych jednostek — tropokolagenu. Potwierdzono to następnie przy zastosowaniu precyzyjniejszych przyrządów (32), a Halloni i Doty (28) zdołali otrzymać zdjęcie cząsteczki tropokolagenu. Zbudowana jest ona z trzech owijających się wzajemnie łańcuchów polipeptydowych połączonych wiązaniami poprzecznymi. Trzy formy w jakich występuje tropokolagen α , β i γ (82, 85), różnią się ilością poprzecznych wiązań pomiędzy podjednostkami (16, 17, 35, 78, 83). Początkowo podjednostki te połączone są ze sobą słabymi siłami, a w miarę wykształcania się makrocząsteczki łączą się silnymi wiązaniami kowalentnymi. Im więcej poprzecznych wiązań zawiera tropokolagen tym jego rozpuszczalność jest mniejsza.

Interesujące było porównanie metabolicznych aktywności rozpuszczalnych frakcji kolagenu i dojrzałych nierozpuszczalnych włókien kolagenowych. Okazało się, że okres półtrwania dojrzałych włókien wynosi około 300 dni (62), natomiast frakcja kolagenu rozpuszczalnego w 0,14 M NaCl jest odnawiana w czasie 5—24 godzin (33). Szybkość odnowy kolagenu rozpuszczalnego w bardziej stężonych roztworach soli lub w kwaśnym środowisku była odpowiednio mniejsza. Badania nad szybkością wbudowywania proliny znakowanej ^{14}C do kolagenu zwierząt wykazały istnienie dwóch niezależnych pul kolagenu charakteryzujących się dużą szybkością odnowy.

II. Wolna i związana hydroksyprolina w surowicy

Pomimo stosowania chromatografii bibułowej oraz metod mikrobiologicznych umożliwiających wykrycie i oznaczenie ilościowe poszczególnych aminokwasów w surowicy, nie udało się wykazać w surowicy krwi ludzkiej stałej obecności hydroksyproliny (50, 59, 60). Nawet me-

todą chromatografii jonowymiennej nie zdołano określić jej stężenia (11, 67, 89, 92). Dopiero zastosowanie chromatografii kolumnowo-bibułowej pozwoliło wykazać, że hydroksypolina jest stałym składnikiem surowicy krwi zdrowego człowieka chociaż stężenie jej jest jednym z najniższych w porównaniu do innych aminokwasów (7). Hydroksypolinę oznacza się kolorymetrycznie, w oparciu o specyficzną reakcję barwną aldehydu p-aminobenzoesowego (odczynniki Ehrlicha) z produktem otrzymanym po utlenieniu i dekarboksylacji hydroksypolicy (65). Najczęściej stosowane są metody Prockopa (77) i Stegemana (90).

Prac, w których do oznaczania wolnej hydroksypolicy w surowicy stosowano specyficzne metody jest niewiele (3, 4, 13, 47, 51, 74). Jedynie dwie publikacje zawierają dokładne badanie poziomu tego aminokwasu w surowicy ludzkiej i obejmują duży materiał (54, 70).

Tablica 1

Stężenie wolnej i związanej peptydowo hydroksypolicy w $\mu\text{g/ml}$ surowicy krwi ludzi i niektórych zwierząt

Materiał	Metoda	Autor	Liczba przypadków	Hydroksypolina	
				wolna	całkowita
Koń	Chromatografia bibułowa (barw. izatyną)	Westfall (95)	2	2	6
Szczur	Modyf. Prockop'a	Bates (4)	32	10	24
Człowiek	Wiss'a	Kivirikko (47)	10	1,4	—
	Prockop'a	Prockop (75)	2	1,2—1,6	2,5—2,6
		Laitinen (54)	38	1,05	—
	Stegemanna	Kobrlé (51)	10	2,4	2,4
		Oye (70)	10	0,92	—
		Bauman (3)	38	2,4	—

Laitinen i wsp. (54) uważają, że poziom wolnej hydroksypolicy zależy od wieku i płci. Są to jednak wahania niewielkie i wartości średnie różnią się nie więcej niż o 10%. Stężenie wolnej hydroksypolicy w surowicy ludzi i niektórych zwierząt zestawiono w tablicy 1. Średnie ilości tego iminokwasu mieszczą się w granicach od 0,92—2,4 $\mu\text{g/ml}$. Są to małe wahania, szczególnie, jeśli uwzględni się stosowanie różnych metod oznaczania i niejednakową dietę badanych osobników. Hydroksypolina stanowi około 0,3% sumy wszystkich wolnych aminokwasów surowicy i występuje tam w ilościach wielokrotnie niższych niż inne aminokwasy. Hess i Schaffran (31) oraz Wolf i wsp. (97) wskazują, że podana hydroksypolina jest szybko usuwana z surowicy bądź ulegając rozpadowi bądź wydalaniu do moczu i uważają, że wolna hydroksypolina moczu pochodzi z endogennych źródeł, a więc z kolagenu lub jego prekursora

Hydroksyprolinę związaną peptydowo oznaczano w surowicy szczura (4), konia (95) i człowieka (51, 75) (tablica 1). Według badań Kobrle i wsp. (51) w surowicy ludzkiej nie występuje hydroksyprolina związana, jedynie u kobiet ciężarnych wykryli oni te połączenia w znikomych ilościach ($0,3 \mu\text{g/ml}$). Jest to interesujące ze względu na obecność znacznych ilości tych związków w moczu. Wskazuje to, po wykluczeniu możliwości tworzenia się ich w kłębkach i kanalikach nerkowych, na bardzo wysoki „clearance” nerkowy i brak reabsorpcji w kanalikach. Istotnie Prockop i wsp. (75) uzyskali po podaniu żelatyny kilkunastokrotne zwiększenie stężenia peptydów hydroksyprolinowych w surowicy i stwierdzili bardzo szybkie wydalanie ich w moczu.

III. Hydroksyprolina w moczu

W moczu wolna hydroksyprolina występuje podobnie jak w surowicy, w bardzo małych ilościach i była jednym z najpóźniej wykrytych aminokwasów. Wiele publikacji podaje zawartość hydroksyproliny wolnej i związanej peptydowo w moczu osobników zdrowych. Średnie z war-

Tablica 2

Stężenie wolnej i związanej hydroksyproliny w moczu ludzi dorosłych

Metoda	Autor	Liczba przypad- ków	Hydroksyprolina				
			wolna	całkowita			
			mg/dobę	mg/dobę	mg/kg/dobę	mg/m ² /dobę	
Prockop	Benoit (5)			M 38,3 21,8—59,4 K 27,0 11,4—35,3	—	M 19,2 K 16,4	
	Jasin (36)	11	—	32,9 14,5—54,1	—	18,1 9,3—30,6	
	Jones (38)	12	—	13—65	—	—	
	Smith (88)	20	—	—	0,38	—	
	Laitinen (54)	48	0,60 0,30—1,33	25,8 15,1—42,8	—	14,4 9,2—23,8	
	Lee (53)	22	—	15—65	—	—	
	Korting (52)		—	14,9—33	—	—	
	Platt (73)	8	—	21 9—28	—	—	
	Ney (66)	4	—	24	—	—	
	Kivirikko (46)	11	0,67	29,1 18,8—40,9	—	—	
	Woessner	Matiasavic (56)	28	—	37 20—50	—	—
	Neuman Logan	Goidanich (23)	42	0	—	—	17,6 15,2—19,4

M—Mężczyźni

K—Kobiety

tości uzyskanych z większej ilości przypadków za pomocą specyficznych metod oznaczania (65, 77, 90) zebrano w tablicy 2. Wolna hydroksypolina stanowi w moczu zaledwie 3% całkowitej hydroksyproliny (76, 99). Ilości wolnej hydroksyproliny w dobowym moczu osobników dorosłych wahają się według różnych autorów od 0,30 do 1,33 mg/dobę. Należy podkreślić, że Goidanich i wsp. (23) nie stwierdzili w ogóle wolnej hydroksyproliny w moczu badanych 42 pacjentów, a nie można też wykluczyć, że część wolnej hydroksyproliny w moczu pochodzi z zawierających ten iminokwas peptydów, które mogą rozpadać się w pęcherzu moczowym lub podczas zbierania dobowej porcji moczu.

Dorośli, zdrowi osobnicy wydzielają z moczem w ciągu 24 godzin około 1 g peptydów, z czego około 50 mg przypada na peptydy zawierające hydroksyprolinę. Graniczne wartości dla związanej hydroksyproliny w moczu zdrowych osobników dorosłych wynoszą 9–65 mg/dobę (tablica 2). Wydalanie związanej hydroksyproliny przeliczano też na jednostkę wagi (88) lub powierzchni ciała (23). Według Lee i Loyd'a

Tablica 3

Skład aminokwasowy zawierających hydroksyprolinę peptydów moczu

Numer peptydu	Aminokwasy	Literatura
1	Pro-OH, Pro, Gli, Ala, Glu, Asp, Liz, Leu, Wal, Arg	29
2	Pro-OH, Pro, Gli, Ala, Glu, Asp, Liz(?), Wal, Arg	29
3	Pro-OH, Pro, Gli, Ala, lub Tyr, Ser, Treo	43
4	Pro-OH, Pro, Gli, Ala lub Tyr, Asp, Ser	43
5	Pro-OH, Gli, Ala, Glu, Liz, Arg	29
6	Pro-OH, (?), Ala, Glu, Asp	9
7	Pro-OH, Pro, Gli, Asp, Liz	43
8	Pro-OH, Pro, Gli, Ala, Asp	43
9	Pro-OH, Glu ₂	58
10	Pro-OH, Pro, Gli	58
11	Pro-OH ₄ , Pro ₄ , Glu	57
12	Pro-OH ₂ , Pro ₃ , Glu ₉	57
13	Pro-OH, Pro	43, 58, 72, 94

(53) wydalanie u tego samego osobnika w różnych dniach wynosiło: 46, 60, 47, 30, 43 i 40 mg/dobę. Jeszcze mniejszy rozrzut, wynoszący tylko 16% między granicznymi wartościami, podali Jones i wsp. (37).

Kibrick i wsp. (43) oraz Meilman i wsp. (58) stwierdzili u kilkunastu osobników duże podobieństwo poszczególnych frakcji peptydów hydroksyprolinowych wydanych w moczu.

W 1955 r. Westall (94) wykrył dwupeptyd hydroksyprolinowy badając aminokwasy wydane w moczu. Była to prolilohydroksypolina

(43, 58, 72). Od tego czasu wyodrębniono kilkanaście peptydów hydroksyprolinowych zbudowanych z kilku a nawet z dziesięciu aminokwasów (9, 29, 43, 57) (tablica 3). Ich skład aminokwasowy świadczy, że pochodzą one z metabolicznego rozpadu kolagenu tkankowego.

Dwupeptyd Westalla stanowi około 60%, a trójpeptyd glicylo-hydroksyprolilo-prolina — 15% wszystkich peptydów hydroksyprolinowych moczu. Układ aminokwasów w obu peptydach jest sekwencją typową dla normalnego kolagenu (27, 86).

Należy iednak podkreślić, że większość peptydów występujących w moczu otrzymano w minimalnych ilościach, co ograniczało badania do oznaczeń jakościowych, a ponadto mogły one być zanieczyszczone innymi peptydami, powstającymi jako artefakty podczas wyodrębniania.

IV. Wydalanie hydroksyproliny w zależności od wieku i okresu wzrostu

O zwiększonym wydalaniu aminokwasów w moczu kilkuletnich dzieci doniósł już w 1914 roku Rabinovitch (79). Berger (6) zaobserwował najszybciej następujące wydalania aminokwasów do 7 dnia życia oraz ponowne wzmożenie wydalania w okresie dojrzewania płciowego. Przeliczając uzyskane wyniki na kilogram wagi ciała ustalił on, że kilkutygodniowe niemowlęta wydalają względnie największe ilości aminokwasów, a od tego okresu, aż do późnej starości następuje spadek z małym zahamowaniem w okresie dojrzewania.

O'Brien i wsp. (10) stwierdzili, że w moczu kilkutygodniowego dziecka wolna hydroksyprolina jest jednym z kilku obficie występujących aminokwasów, podczas gdy w późniejszym okresie i u ludzi dorosłych występuje ona w ilościach śladowych. Przyczyną tego zjawiska nie jest podwyższenie poziomu wolnej hydroksyproliny w surowicy, lecz najprawdopodobniej mała zdolność wchłaniania zwrotnego tego aminokwasu w kanalikach nerkowych w pierwszym okresie życia noworodka. Dopiero w późniejszym okresie następuje całkowite wykształcenie reabsorpcji, co powoduje obniżanie poziomu wolnej hydroksyproliny w moczu.

O blisko dwukrotnie większym wydalaniu wolnej hydroksyproliny przez młode szczury (25 $\mu\text{g}/\text{dobę}$) w porównaniu do szczurów starych (14 $\mu\text{g}/\text{dobę}$) donosili Kivirikko i Liesmaa (47), tłumacząc to większym wydzielaniem hormonu wzrostu u osobników młodych. Teoretyczne podstawy do przypuszczeń, że ilość związanej hydroksyproliny w moczu może zależeć od szybkości wzrostu, dały badania Grossa (25), który stwierdził, że u świnek morskich wraz z wiekiem systematycznie maleją frakcje kolagenu rozpuszczalne w zimnych roztworach soli. Spostrzeżenia te potwierdzono u innych zwierząt i u ludzi (1, 8, 39, 93). Ponieważ rozpuszczalny kolagen jest frakcją metabolicznie aktywniejszą jej zmniejszenie w organizmie powinno powodować obniżenie się po-

ziomu związanej hydroksyproliny w moczu. Biorąc to pod uwagę J a s i n i wsp. (36) porównali poziom związanej hydroksyproliny w moczu osobników w różnym wieku (tablica 4). Największe wydalenie (w wartościach bezwzględnych) stwierdza się u młodzieży w okresie dojrzewania, jednak po przeliczeniu na m² powierzchni ciała, co według Jasina jest bardziej właściwe, największe ilości związanej hydroksyproliny występują w moczu u niemowląt, a najmniejsze u osobników dorosłych. Bardziej szczegółowe oznaczenia, z podziałem na jednoroczne grupy, przeprowadzili J o n e s i wsp. (37) i stwierdzili również maksymalne wydalenie całkowitej hydroksyproliny u młodzieży w 14 i 15 roku życia. Istnienie zależności między szybkością wzrostu organizmu i ilością hydroksyproliny w moczu jest już bezsporne (19, 23, 51, 53).

T a b l i c a 4

Wydalenie hydroksyproliny z moczem u osobników w różnym wieku (36)

Grupa badana	Liczba przypadków	Hydroksyprolina całkowita	
		mg/dobę	mg/dobę/m ²
Niemowlęta 0—1 rok	7	32,7	102,2
Dzieci 1—10 lat	21	49,0	66,1
Młodzież 10—14 lat	12	103,7	80,5
Dorośli	12	32,9	18,1

Z tym zagadnieniem łączy się wpływ hormonu wzrostowego na metabolizm kolagenu. B a n f i e l d (2) stwierdził u starych chomików po wstrzyknięciu hormonu wzrostowego, zwiększenie rozpuszczalnej w kwasie octowym frakcji kolagenu skóry. D a u g h a d a y i M a r i z (12) wykazali przyspieszenie wbudowywania znakowanej na węglu proliny do kolagenu chrząstki pod wpływem hormonu wzrostu.

Interesujących danych dostarczyły oznaczenia całkowitej hydroksyproliny w moczu osobników karłowatych bądź dzieci z wyraźnym opóźnieniem wzrostu. Według J a s i n a i wsp. (19, 36) wydalenie całkowitej hydroksyproliny u dzieci z karłowatością przysadkową jest kilkakrotnie mniejsze niż u osobników z prawidłowym wzrostem. Autorzy ci podając dwojgu dzieciom z karłowatością 2,5 mg hormonu wzrostu dziennie zaobserwowali wyraźne zwiększenie całkowitej ilości hydroksyproliny w moczu do poziomu charakterystycznego dla okresu szybkiego wzrostu. Po zaprzestaniu podawania hormonu wydalenie hydroksyproliny obniżyło się do poziomu przed leczeniem.

Natomiast u pacjentów z aktywną akromegalią stwierdzono wydalenie znacznie zwiększonych ilości hydroksyproliny, które po leczeniu promieniowaniem wracały do normy (5, 15, 36).

M a t i a s e v i c i G e r s h b e r g (56) wykazali obniżone wydalenie hydroksyproliny u dwojga dzieci, u których leczenie przez długi okres

czasu kortykosteroidami, wywołało zahamowanie szybkości wzrostu. U dzieci tych w czasie leczenia hormonem wzrostu nastąpiło blisko trzykrotne przyspieszenie wzrostu i zwiększenie wydalania hydroksyproliny w moczu. Po odstawieniu hormonu ilość tego iminokwasu zmniejszyła się do wartości przed leczeniem — wyraźnie niższych niż odpowiadałoby to danej grupie wieku. Z obserwacji tych wynika, że hormon wzrostowy powoduje zwiększenie syntezy kolagenu przy jednoczesnym przyspieszeniu jego przemian. Oznaczanie hydroksyproliny w moczu może być pomocne w rozpoznawaniu wczesnej akromegalii może służyć jako wskaźnik prawidłowości wzrostu dzieci.

V. Wydalanie hydroksyproliny w różnych schorzeniach

Związek między wydalaniem peptydów zawierających hydroksyprolinę a metabolizmem kolagenu zwrócił uwagę wielu badaczy na zagadnienie określania całkowitej hydroksyproliny w moczu w wielu różnych schorzeniach, o których wiadano lub przypuszczano, że dotyczą przemian kolagenu lub tkanki łącznej.

O wpływie na metabolizm kolagenu tyroksyny, której podanie szczurom spowodowało wzrost hydroksyproliny w moczu donieśli K i v i r i k k o i wsp. (44, 45). U pacjentów z hipertyreoidyzmem poziom hydroksyproliny w surowicy jest podwyższony, a wydalanie zarówno wolnej jak i związanej hydroksyproliny w moczu wyraźnie zwiększone (15, 46). Ta równoległość podwyższenia poziomu hydroksyproliny w surowicy i moczu wskazuje, że powodem są zmiany w metabolizmie kolagenu, a nie czynnik nerkowy. Natomiast w hypotyreoidyzmie (41) oraz w kretynizmie (36) stwierdzono obniżenie wydalania hydroksyproliny.

Drugą liczną grupę schorzeń stanowiły choroby, w których występuje destrukcja kolagenu związana ze znacznym podwyższeniem wydalania hydroksyproliny.

D u l l i wsp. (14) lecząc parathormonem pacjentów z niedoczynnością przytarczyc zaobserwowali wzrost wydalania w moczu najpierw fosforu, następnie wapnia, a w pięć dni później hydroksyproliny. Przypuszczają oni, że mobilizacja mineralnej substancji kości jest sprawą wtórną, a pierwotnie następuje degradacja kolagenu stanowiącego organiczną substancję podstawową kości. K e i s e r i wsp. (42) na podstawie analogicznych badań doszli do wniosku, że parathormon powoduje rozpad kolagenu kości. Natomiast K l e i n i C u r t i s (49) uważają, że w hyperparatyreoidyzmie następuje przyspieszenie syntezy rozpuszczalnego kolagenu kości, ponieważ u pacjentów z tym schorzeniem stwierdzono zarówno podwyższone jak i leżące w granicach prawidłowych wartości hydroksyproliny w moczu (15, 48). Jednakże najwyższe wartości stwierdzono przede wszystkim u pacjentów z aktywną postacią schorzeń, u któ-

rych występowały zmiany patologiczne w kościach — co przemawiałoby za koncepcją degradacji. Ostatnio interesujące doświadczenia rozstrzygające tę kwestię przeprowadzili Harris i Sjoerdsma (30). Podawali oni szczurom znakowaną ^{14}C -prolinę a następnie po kilku tygodniach w jednym doświadczeniu i po kilku miesiącach w drugim podawali wyciąg przytarczyc powodując szybki wzrost wydalania hydroksyprowliny. Względna aktywność znakowanej hydroksyprowliny w moczu nie zmieniała się pod wpływem podawania wyciągu, natomiast ilość wydalonej całkowitej hydroksyprowliny zwiększała się prawie dwukrotnie. Gdyby wzrost wydalania był wynikiem zwiększonej syntezy nowego, nieznakowanego kolagenu, to względna aktywność hydroksyprowliny w moczu powinna maleć odpowiednio do przyrostu hydroksyprowliny całkowitej. Ponieważ zaś hydroksyprowlina wydalana w zwiększonej ilości na skutek działania hormonu pochodziła z uprzednio znakowanej „starszej” puli kolagenu, zatem hormon przytarczyc musi działać bezpośrednio na dojrzwały kolagen.

Główna część (40%) całkowitego kolagenu w organizmie znajduje się w substancji podstawowej kości. Fakt ten, jak również większa szybkość przemiany kolagenu w kościach niż w innych tkankach (24) pozwalały przypuszczać, że jego katabolizm jest głównym źródłem peptydów hydroksyprowlinowych moczu (14, 15). Zatem wszystkie schorzenia obejmujące substancję podstawową kości i powodujące jej destrukcję oraz stany, którym towarzyszy wzrost aktywności osteoblastów powinny wywołać podwyższenie poziomu hydroksyprowliny w moczu.

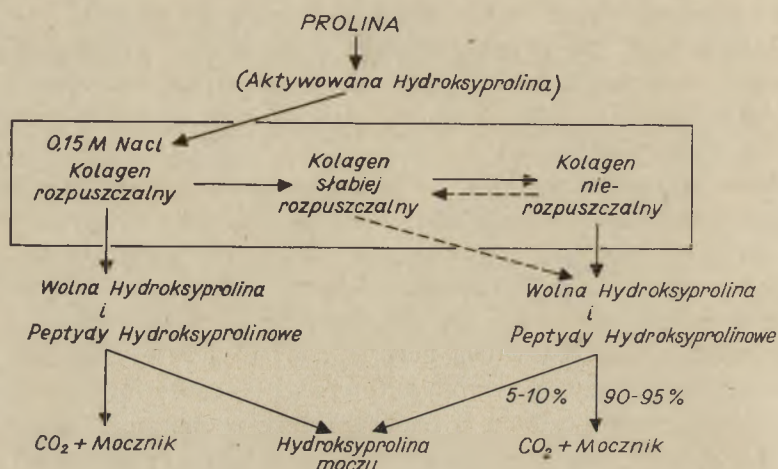
Liczni autorzy (5, 15, 23, 54) badając wydalanie hydroksyprowliny w chorobie Pageta stwierdzili zgodnie we wszystkich badanych przypadkach podwyższony poziom hydroksyprowliny w moczu.

Również w przypadkach inwazji komórek nowotworowych do kości i jej kolagenu z towarzyszącą destrukcją tych tkanek stwierdzono u wszystkich pacjentów zwiększone wydalanie hydroksyprowliny, przy czym poziom hydroksyprowliny w moczu zależał od stopnia rozwoju choroby (73).

W zespole Marfana obserwuje się również znaczne wydalanie peptydowo związanej hydroksyprowliny (87). Jones i wsp. (38) stwierdzili 3—5 razy wyższy poziom związanej hydroksyprowliny w moczu pacjentów z klasycznym zespołem Marfana, w porównaniu do wartości u dorosłych osobników zdrowych w odpowiedniej grupie wieku. W grupie chorych w wieku 11—15 lat różnice nie były tak znaczne ze względu na duże wahania osobnicze. Wprawdzie podstawy defektu metabolicznego w tym schorzeniu są jeszcze nieznanne, wiemy jednak, że obejmuje ono nienormalną syntezę kolagenu połączoną prawdopodobnie z podwyższonym jego metabolizmem.

W jakim stopniu wydalanie peptydowo związanej hydroksyprowliny może odzwierciedlać zmiany w metabolizmie kolagenu zależy również

od tego w jakim procencie peptydy uwolnione z kolagenu tkankowego przechodzą w postaci niezmienionej do moczu. Duża ich część mogłaby ulegać przemianie do innych aminokwasów, dwutlenku węgla czy też mocznika. Prockop (74) wyliczył na podstawie czasu półtrwania nierozpuszczalnego kolagenu (50—100 dni), że ilość hydroksyproliny powstającej z rozkładu nierozpuszczalnego kolagenu szczura wynosi 5—12 mg na dobę. Ponieważ szczury wydalały 0,9 mg hydroksyproliny dziennie, a tylko około $\frac{2}{3}$ tej ilości pochodziło z nierozpuszczalnego kolagenu, zatem według Prockopa zaledwie 5—10% hydroksyproliny powstającej wskutek rozpadu nierozpuszczalnego kolagenu jest wydalane do moczu (rysunek 1).



Rys. 1. Rozpad rozpuszczalnego i nierozpuszczalnego kolagenu do wolnej hydroksyproliny i peptydów hydroksyprolinowych moczu (55)

VI. Uwagi końcowe

Poziom hydroksyproliny w moczu osobników zdrowych jest względnie stały i dzięki temu oznaczanie jej może mieć znaczenie kliniczne w niektórych schorzeniach. Na pierwszym miejscu wymienić należy diagnostykę i ocenę efektów leczenia chorób tarczycy, szczególnie w tych przypadkach, w których niemożliwe jest oznaczenie związanego z białkiem jodu. Ponadto oznaczanie hydroksyproliny w moczu może służyć jako wskaźnik odpowiedzi organizmu na terapię hormonem wzrostu a także określać stopień aktywności akromegalii oraz postęp choroby w niektórych schorzeniach kości.

Po pierwszych doświadczeniach wskazujących na powiązanie przemiany kolagenu z wydalaniem hydroksyproliny spodziewano się znaleźć najwyższe wartości tego aminokwasu w schorzeniach obejmujących uogólnione zmiany w tkance łącznej. Dlatego też chorzy z *rheumatoid*

arthritis, *lupus erythematosus* i sklerodermią stanowili pierwszą grupę pacjentów, u których zbadano wydalanie hydroksyproliny w moczu. Jednak otrzymane dla tej grupy chorych wartości nie odbiegały znacznie od prawidłowych (99). Jedynie w aktywnej fazie sklerodermii zaobserwowano dwukrotnie wyższe niż u zdrowych ilości hydroksyproliny w moczu. Nie stwierdzono podwyższonego poziomu peptydów hydroksyprolinowych w moczu podczas poporodowego zwijania się macicy u szczurów (96) pomimo znikania w tym okresie znacznych ilości kolagenu z tkanek. Fakt ten można częściowo tłumaczyć tym, że kolagen całego organizmu lub nawet pojedynczej tkanki nie może być uważany za homogeniczny. Większość tkanek zawiera kolagen o różnej rozpuszczalności i o różnej szybkości odnowy (33) a ilość wydalonej hydroksyproliny będzie zależna od tego jaka frakcja jest objęta schorzeniem. Z drugiej strony, zgodnie z sugestią Prockopa (74), być może tylko mała część uwolnionej z kolagenu hydroksyproliny jest wydalana w moczu w postaci niezmienionej. Zatem tylko znaczne zmiany metaboliczne kolagenu powodowałyby wyraźne zmiany ilości wydalonej w moczu wolnej i związanej peptydowo hydroksyproliny. Poglądy Prockopa wymagają jeszcze potwierdzenia, tym bardziej, że dostające się do krwi peptydy hydroksyprolinowe są szybko wydalone do moczu. Wskazują na to śladowe ilości tych peptydów w normalnej surowicy ludzkiej oraz szybkie obniżanie ich poziomu w surowicy i pojawianie się ich w moczu w przypadku obciążenia organizmu ludzkiego żelatyną lub innym białkiem bogatym w hydroksyprolinę.

Nie wyjaśniono jeszcze czy nierozpuszczalny kolagen, tak jak frakcja kolagenu rozpuszczalnego rozpada się bezpośrednio do peptydów moczu czy też przekształca się przed rozpadem w bardziej rozpuszczalną formę (rysunek 1). Ponadto nie wiadomo, czy słuszne są dotychczasowe poglądy o pochodzeniu peptydowo związanej hydroksyproliny w moczu. Ostatnie badania (14) przy zastosowaniu proliny znakowanej na węglu, wskazywałyby, że wolna i związana hydroksyprolina w moczu pochodzą zarówno ze świeżo zsyntetyzowanych cząsteczek kolagenu, które tworzą tak zwany rozpuszczalny kolagen tkanek jak i z rozpadu dojrzałych nierozpuszczalnych włókien kolagenowych.

LITERATURA

1. Bakerman S., *Nature* **196**, 375 (1962).
2. Banfield W. G., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **97**, 309 (1958).
3. Baumann H., Fritze E., Kallweit C., *Klin. Wschr.* **42**, 786 (1964).
4. Bates W. K., McGowen J., Talmage R. V., *Endocrinology* **71**, 189 (1962).
5. Benoit F. L., Theil G. B., Watten R. H., *Metabolism* **12**, 1072 (1963).
6. Berger H., *Schweiz. Med. Wschr.* **24**, 86 (1965).
7. Bober S., Kruze D., Dąbrowa R., Iwańska J., Skrzypczyk E., *Pol. Arch. Med. Wewn.* **32**, 443 (1962).

8. Boucek R. J., Norble N. L., Woessner J. F., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **72**, 1016 (1959).
9. Boulanger P., Biserte G., *Expos. Ann. Biochim. Med.* **18**, 123 (1956).
10. O'Brien D., Butterfield L. J., *Arch. Dis. Childh.* **38**, 437 (1963).
11. Cusworth D. C., Dent C. E., *Biochem. J.* **74**, 550 (1960).
12. Daughaday W. H., Mariz A. R., *J. Lab. Clin. Med.* **59**, 741 (1962).
13. Dubovsk'y J., Pacorsk'y V., Dubovska E., *Clin. Chim. Acta* **12**, 230 (1965).
14. Dull T., Causing L., Henneman P. H., *J. Clin. Invest.* **41**, 1355 (1962).
15. Dull T. A., Henneman P. H., *New Engl. J. Med.* **268**, 132 (1963).
16. Engel J., *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 150 (1962).
17. Engel J., *Z. Physiol. Chem.* **329**, 69 (1962).
18. Faure-Fremiet M. E., Garrault A., *Arch. Anat. Microbiol.* **33**, 81 (1937).
19. Fink C. W., Jasin H., Ziff M., *Am. J. Dis. Child.* **104**, 562 (1964).
20. Gallop P. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **54**, 486 (1955).
21. Gallop P. M., Seifter S., Meilman E., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 545 (1957).
22. Gerber G. B., Gerber G., Altman J. K., *J. Biol. Chem.* **235**, 2653 (1960).
23. Goidanich J. F., Lenzi L., Silva E., *Clin. Chim. Acta* **11**, 35 (1965).
24. Gould B. S., Manner G., Goldman H. M., Stolman J. M., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **85**, 385 (1960).
25. Gross J., *J. Exptl. Med.* **107**, 265 (1958).
26. Gross J., Highberger J. H., Schmitt F. O., *Proc. Natl. Acad. Sci. US* **41**, 1 (1955).
27. Gross F., *Protein Metabolism*, Berlin 1962.
28. Hall C. E., Doty P., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1269 (1958).
29. Hansen H., Fittkau S., *Z. Physiol. Chem.* **313**, 152 (1958).
30. Harris E. D., Sjoerdsma A., *J. Clin. Endocrin. Met.* **26**, 358 (1966).
31. Hess W. C., Schaffran J. P., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 474 (1951).
32. Highberger J. H., Gross J., Schmitt F. O., *Proc. Natl. Acad. Sci. US* **37**, 286 (1951).
33. Jackson D. S., Bentley J. P., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**, 37 (1960).
34. Jackson D. S., Fessler J. H., *Nature* **179**, 69 (1955).
35. Jackson D. S., *Div. Biol. Chem. Am. Soc.* **21**, 8 (1962).
36. Jasin H. E., Fink C. W., Wise W., Ziff M., *J. Clin. Invest.* **41**, 1928 (1962).
37. Jones C. H., Bergman M. W., Kittner P. J., Pigman W. W., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **115**, 85 (1964).
38. Jones C. H., Bergman M. W., Kittner P. H., Pigman W., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **116**, 931 (1964).
39. Kao K., McGavack T. H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **101**, 153 (1959).
40. Kao K., Hilker D., McGavack T. H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **106**, 121 (1961).
41. Keiser H. R., Sjoerdsma A., *J. Clin. Invest.* **41**, 1371 (1962).
42. Keiser H. R., Gill J. R., Sjoerdsma A., Bartter F. C., *Clin. Res.* **11**, 41 (1963).
43. Kibrick A. C., Hashiro C., Safier L. B., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **109**, 473 (1962).
44. Kivirikko K. I., Koivusalo M., Laitinen O., Liesmaa M., *Acta Physiol. Scand.* **57**, 462 (1963).
45. Kivirikko K. I., Koivusalo M., Laitinen O., *Acta Physiol. Scand.* **61**, 49 (1964).
46. Kivirikko K. I., Koivusalo M., Laitinen O., Lamberg B. A., *J. Clin. Endocrin. Metab.* **24**, 222 (1964).

47. Kivirikko K. I., Liesmaa M., *Acta Endocrin.* **27**, 441 (1958).
48. Klein L., Albertsen K., Courtiss P. H., *Metabolism* **11**, 1023 (1962).
49. Klein L., Courtiss P. H., w *Dynamic Studies of Metabolic Bone Disease* red. F. A. Davis, Philadelphia 1964.
50. Knauff H. G., Dieterle P., Zickgraf H., *Z. Physiol. Chem.* **186**, 316 (1959).
51. Kobrle V., Budinsky J., Chvopil M., *Czas. Lek. Ces.* **102**, 241 (1963).
52. Kortling G. W., Holzmann H., *Klin. Wochschr.* **43**, 361 (1965).
53. Lee C. A., Lloyd H. M., *Med. J. Australia* **1**, 992 (1964).
54. Laitinen O., Nikkila E. A., Kivirikko K. I., *Acta Med. Scand.* **179**, 275 (1966).
55. Martin G. R., Mergenhagen S. E., Prockop P. J., *Nature* **191**, 1008 (1961).
56. Matiasovic O., Gershberg H. G., *Metabolism* **15**, 720 (1966).
57. Mechanic G., Skupp S. J., Safier L. B., Kibrick A. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **86**, 71 (1960).
58. Meilman E., Urivetzky M. M., Rapoport C. M., *J. Clin. Invest.* **42**, 40 (1963).
59. Mc Menamy R. H., Lund C. C., Lawrance J., *J. Clin. Invest.* **36**, 1672 (1957).
60. Mutting D., *Der Aminosäuren-Haushalt des Menschen*, Aulendorf 1959.
61. Nageotte J., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **97**, 559 (1927).
62. Neuberger A., Niven J. S., *J. Physiol.* **112**, 292 (1951).
63. Neuberger A., Perrone J. C., Slach H. G., *Biochem. J.* **49**, 199 (1951).
64. Neuberger A., Richards F. F., w *Mammalian Protein Metabolism* tom I, red. H. N. Munro i J. B. Allison, New York 1964, str. 265.
65. Neuman R. E., Logan M., *J. Biol. Chem.* **184**, 299 (1950).
66. Ney R. L., Gill J. R., Keiser H. R., Bartter F. C., *J. Clin. Endocrin. Met.* **26**, 815 (1966).
67. Oepen H., Oepen I., *Klin. Wochschr.* **41**, 921 (1963).
68. Orekowicz W. N., Szpikiter V. O., Mazurow V. I., Kunina O. V., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **42**, 505 (1960).
69. Orekowicz W. N., Tustanowski A. A., Orekowicz K. D., Plotnikowa N. E., *Biochimija* **13**, 55 (1948).
70. Oye J., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **14**, 259 (1962).
71. Partridge S. M., w *Advances in Protein Chemistry*, tom 17, red. C. B. Anfinsen, M. L. Anson, K. Bailey, J. T. Edsall, New York 1962, str. 248.
72. Plaquet P., Biserte G., Boulanger P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **42**, 393 (1960).
73. Platt W. D., Doolittle L. H., Hartshon J. W. S., *New Engl. J. Med.* **271**, 287 (1964).
74. Prockop D. J., *J. Clin. Invest.* **43**, 453 (1964).
75. Prockop D. J., Keiser H. R., Sjoerdsma A., *Lancet* **2**, 527 (1962).
76. Prockop D. J., Sjoerdsma A., *J. Clin. Invest.* **40**, 843 (1961).
77. Prockop D. J., Udenfriend S., *Anal. Biochem.* **1**, 228 (1960).
78. Piez K. A., Eigner E. A., Lewis M. S., *Biochemistry* **2**, 58 (1963).
79. Rabinovitch L. N., *Comp. Rend. Soc. Biol.* **66**, 457 (1914).
80. Robertson W., *J. Biol. Chem.* **197**, 494 (1952).
81. Rodnan G. P., Cammarata R. J., *Clin. Res.* **11**, 179 (1963).
82. Rubin A. L., Pfahl D., Speckmann P. T., Davison P. F., Schmitt F. O., *Science* **139**, 37 (1963).
83. Schleyer M., *Z. Physiol. Chem.* **329**, 97 (1962).

84. Schmitt F. O., Hall C. E., Jakus M. A., *J. Cellular Comp. Physiol.* **20**, 11 (1942).
85. Schmitt F. O., *Leder* **14**, 1 (1963).
86. Schrohenloher E. R., Ogle J. D., Logan M. A., *J. Biol. Chem.* **234**, 58 (1959).
87. Sjoerdsma A., Davidson J. D., Udenfriend S., Mitoma C., *Lancet* **2**, 994 (1958).
88. Smith D. A., Nordin B. E. C., *Proc. Roy. Soc. Med.* **57**, 868 (1964).
89. Soupart P., *Clin. Chim. Acta* **5**, 235 (1960).
90. Stegemann H., *Z. Physiol. Chem.* **311**, 41 (1958).
91. Stein W. H., Miller E. G., *J. Biol. Chem.* **125**, 599 (1938).
92. Stein W. H., Moore S., *J. Biol. Chem.* **211**, 915 (1954).
93. Verzar F., Willenegger H., *Schweiz. Med. Wschr.* **91**, 1234 (1961).
94. Westall R. G., *Biochem. J.* **60**, 247 (1955).
95. Westfall B. B., Peppers E. V., Sanford K. K., Earle W. R., *J. Natl. Cancer Inst.* **15**, 27 (1954).
96. Woessner J. F., *Biochem. J.* **33**, 304 (1962).
97. Wolf G., Heck W. W., Leak J. C., *J. Biol. Chem.* **223**, 95 (1956).
98. Zachariades P. A., w *Advances in Protein Chemistry* tom 16 red. C. B. Anfinsen, M. L., Anson, K. Bailey, J. T. Edsall New York 1961, str. 64.
99. Ziff M., Kibrick A., Dresner E., Gribetz H. J., *J. Clin. Invest.* **35**, 579 (1956).

JAN HANKIEWICZ*

Metody automatyczne w biochemii klinicznej z zastosowaniem autoanalizatora

Automatic Methods in Clinical Biochemistry with Use of the Autoanalyzer

General principles of automatic methods using the autoanalyser in clinical biochemistry are described.

Jednym z podstawowych elementów racjonalizacji w analityce jest automatyzacja. Częściowa lub całkowita automatyzacja analizy chemicznej zmniejsza czas wykonania i koszty analizy, wymaga jednak zastosowania odpowiedniej aparatury. Największe dotychczas zastosowanie w praktyce znalazły autoanalizatory amerykańskiej firmy *Courtesy Technicon Instrument Corpor. Chauncey N.Y.* Metodę analizy automatycznej opartą na posługiwaniu się autoanalizatorem przedstawił po raz pierwszy w roku 1957 *Skeggs* (30) w Stanach Zjednoczonych, a później również inni autorzy (5, 22). Autoanalizatory są aparatami w zasadzie zupełnie prostymi w budowie, a że wydajność ich jest duża, szybko amortyzują się i, mimo wysokiej ceny, są opłacalne. Szczególnie szerokie zastosowanie znalazły one w biochemii klinicznej. W niedługim czasie wygasa ochrona patentowa i wyłączność produkowania autoanalizatorów przez firmę *Technicon* można więc spodziewać się, że staną się one bardziej dostępne również dla naszych laboratoriów klinicznych.

I. Możliwości zastosowania autoanalizatora

Analiza za pomocą autoanalizatora opiera się na ciągłym pobieraniu badanego materiału (aspiracja) i dzieleniu go na porcje (segmentacja). Przeznaczony do badania materiał można wprowadzić do aparatu bezpośrednio lub po odpowiednim wstępnym przygotowaniu.

Pobieranie materiału bezpośrednio z przepływającego strumienia znajduje szczególne zastosowanie w analizie przemysłowej do badania stężeń różnych leków, antybiotyków (8, 11), alkoholo-cukrów, estrów

* Dr med., dr fil., adiunkt I Kliniki Chorób Wewnętrznych Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach.

i innych związków (11, 24). Sprzężenie autoanalyzerów z urządzeniem sygnalizacyjno-regulacyjnym umożliwia automatyczną kontrolę procesu technologicznego.

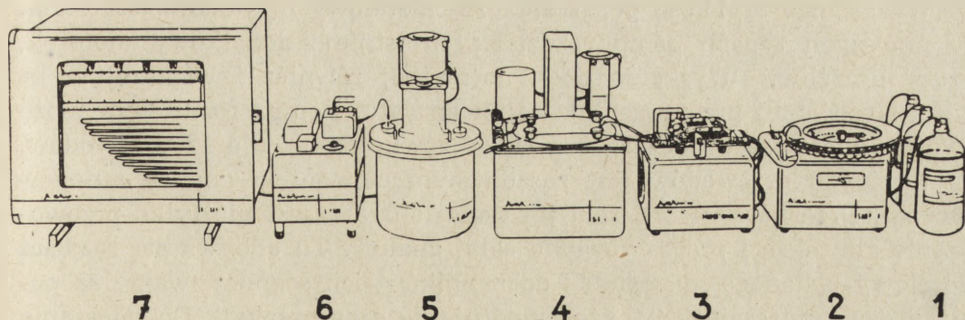
Bezpośrednia aspiracja materiału biologicznego od pacjenta (krew, mocz, sok żołądkowy, wydzielina z przetoki, z ran) daje możliwość stałej kontroli różnych składników, na przykład poziomu mocznika, potasu, transaminaz, rezerwy alkalicznej — przy zagrożeniu mocznicą lub kwasicią oddechową i ustalaniu wskazań do stosowania sztucznej nerki i płuco-serca. Można również tym sposobem badać wpływ różnych preparatów na stan chorego (7, 36), a także skutki obciążenia organizmu na przykład glukozą, żelazem, czy preparatami hormonalnymi.

W biochemii klinicznej najczęściej jednak badany materiał wymaga przygotowania (rozcieńczenia, odbiałczenia, ekstrakowania itp.) przed analizą, a wówczas do autoanalyzera wprowadza się zbiór poszczególnych próbek: krwi, moczu, płynu mózgowo-rdzeniowego, soku żołądkowego, lub dwunastniczego, wyciągu tkankowego itp. pobranych uprzednio od pacjenta (22, 30).

Zastosowanie automatycznej analizy w biochemii klinicznej podlega pewnym ograniczeniom. Metody tej nie należy stosować, gdy liczba analiz jest zbyt mała, ponieważ czas potrzebny do przygotowania aparatu i standardów oraz ocena krzywych znacznie przekracza czas wykonania analizy normalnym sposobem. Automatyczny tok analizy nastawiony jest na metody mikro lub półmikro, to też nie jest wskazane stosowanie go, jeżeli dana metoda wymaga zbyt dużej ilości materiału, czy odczynników, jeżeli stosunki ilościowe badanego materiału i odczynników są bardzo rozbieżne, lub też jeśli ilość materiału w poszczególnych próbkach jest różna, co pociąga za sobą konieczność przeliczeń. Nie można także stosować autoanalyzerów, jeżeli oddzielenie badanego składnika za pomocą dializy nie wystarcza, jeżeli tok analizy wymaga ekstrakowania, sączenia, przemywania, destylacji, odparowania itp. oraz jeśli produkt badany nie jest w stanie płynnym. Nie można też oczywiście stosować automatycznej analizy jeżeli jej wyniki budzą zastrzeżenia, są niepowtarzalne i zbyt rozbieżne w stosunku do wyników uzyskanych metodami manualnymi.

II. Wyposażenie autoanalyzera

Zestaw aparatów autoanalyzera składa się: z odbieralnika próbek, pompy rozdzielczej wraz z zestawem przewodów służących do mechanicznego prowadzenia analizy, dializatora, termostatu, kolorymetru wraz z prostownikiem oraz rejestratora zapisującego wyniki analizy (rysunek 1).



Rys. 1. Schemat autoanalizatora firmy *Technicon Instr. Corp.*

W skład wyposażenia autoanalizatora wchodzi też zestawy odczynników dostosowane do rodzaju zamierzonych badań. Przygotowuje się je w ilościach przewidzianych do wykonania analizy — zwykle z dodatkiem substancji zmniejszającej napięcie powierzchniowe. Ilość odczynników zużywanych w metodzie automatycznej jest niewielka, co obniża koszt badania.

Odbieralnik służy do pobierania materiału i przekazywania go do badania. Jest on wyposażony w motorek obracający tarczę w sposób nieciągły z umieszczonymi na obwodzie próbkami, pobieranymi za pomocą małej zgiętej rurki. Szybkość poruszania się tarczy można regulować — zależnie od potrzeby i ilości próbek (20, 40 i 60 na godzinę).

Istnieją dwa typy odbieralników. Typ I ma na tarczy obrotowej 40 jednego rozmiaru miejsc na próbki. Ponieważ każda z nich musi być obstawiona próbką zerową (wartość odniesienia) zatem tylko połowa miejsc na tarczy stanowi o rzeczywistej wydajności badania wynoszącej, zależnie od szybkości ruchu tarczy 10, 20 lub 30 oznaczeń na godzinę. Odbieralnik typu II wyposażony jest w płuczkę automatycznie wypełniającą się płynem zerowym, dzięki czemu nie traci się połowy miejsc na tarczy, a ponadto — w mikromieszalnik i urządzenie sygnalizacyjne, które włącza się automatycznie z chwilą zakończenia pobierania materiału. Zakres szybkości odbieralnika typu II wynosi od 10 do 120 próbek na godzinę. Jego tarcza ma większe otwory, co pozwala stosować naczynia do próbek w trzech rozmiarach: mikro (0,1 do 2,0 ml), standard (2,5 ml) i makro (10 ml).

Pompa rozdzielcza składa się z synchronicznego motorka sprężonego z układem walców, które umieszczone są na równoległych łańcuchach tworzących pas transmisyjny. Układ ten obracając się dociska metalowymi walcami biegnące pod nim polietylenowe przewody do bakelitowej płytki i wypycha ich zawartość w kierunku dalszych aparatów — równocześnie zasysając nową porcję płynów. Działanie ssąco-tłoczące zapewnia przepływ strumieni i odpowiada pipetowaniu w technice manualnej.

W zasadzie szybkość poruszania się metalowych walców jest stała. W nowszych typach pomp rozdzielczych istnieje dodatkowy motorek, który umożliwia uzyskanie obok normalnej również i większej szybkości stosowanej przy przepłukiwaniu aparatu. Pompa rozdzielcza może swą czynność ssąco-tłoczącą prowadzić równocześnie dla 12 przewodów. Zestaw tych przewodów jest zasadniczym elementem analizy automatycznej. Przeznaczeniem i rolą tej części aparatu jest nie tylko przewożenie ale także i programowanie całej analizy. Tu odbywa się rozdział ilościowy badanego materiału i odczynników, ich segmentowanie za pomocą gazu, mieszanie, a także przedłużanie czasu reakcji. Do mieszania i segmentowania służą różnych kształtów łączniki szklane (najprostsze z nich to „T”, „H” i „Kaktus”) i kolumny spiralne o różnej długości (pojedyncze i podwójne) i o różnych przekrojach. Zastosowanie odpowiednich kolumn szklanych umożliwia również przedłużenie czasu reakcji.

Dobór przewodów i łączników zależy od rodzaju analizy i metody oznaczania. Przez przewody, stosownie do ich przekroju, może przepływać od 0,3 do 3,9 ml cieczy na minutę przy 40 oznaczeniach na godzinę. Rodzaj materiału, z którego zbudowane są przewody zależy od ich przeznaczenia: *Trygon* — stosowany jest do cieczy wodnych, słabych kwasów i odczynników o odczynie alkalicznym; *Solvaflex* — do rozpuszczalników organicznych, szczególnie alkoholi, nie nadaje się natomiast do aldehydów, ketonów i chlorowęglowodorów; *Silastic* — do stężonego kwasu octowego lub jego bezwodnika; *Acidflex* — do stężonych kwasów mineralnych i różnych alkoholi.

Znając przekroje przewodów i czas pobierania materiału przez odbieralnik można samemu obliczyć wzajemne proporcje między ilością próbki badanej a ilością odczynników. Proporcje takie obliczone przy-

Tablica 1

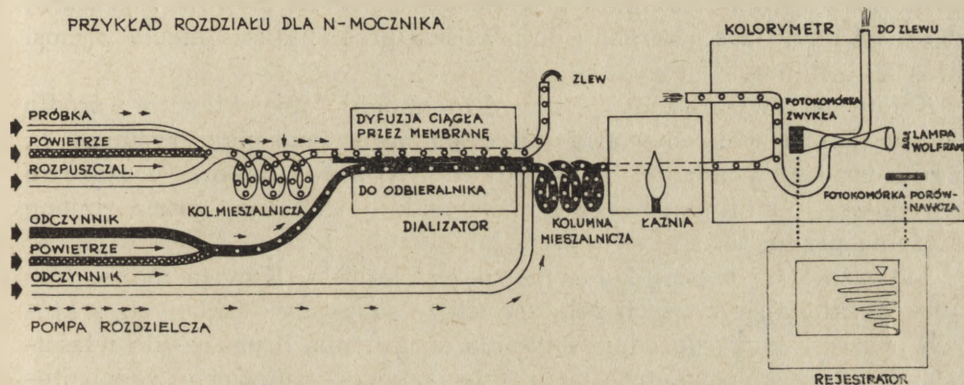
Proporcje ilościowe materiału badanego i odczynników przy automatycznym oznaczaniu mocznika

Przekrój przewodów (w calach)	Objętość w ml pobierana dla każdej próbki materiału badanego — przy liczbie pobieranych próbek na godzinę			Rodzaj pobieranego ma- teriału
	20	40	60	
0,030	0,6	0,3	0,2	próba badanego materiału
0,045	2,1	1,05	0,69	powietrze
0,081	7,5	3,75	2,50	0,9% NaCl + alkohol ka- prylowy
0,081	7,5	3,75	2,50	dwuacetylmonoooksym
0,056	3,0	1,50	0,99	powietrze
0,081	7,5	3,75	2,50	H ₂ SO ₄ i 50% As ₂ O ₃

* 1 cal 25,4 mm

kładowo dla automatycznego oznaczania azotu mocznika przedstawia tablica 1. Zwykle jednak firma *Technicon* dostarcza gotowe schematy, łącznie z zaprogramowanym zestawem przewodów.

Dializator działa na zasadzie dyfuzji składników przez błonę półprzepuszczalną między strumieniem cieczy analizowanej, będącej mieszaniną badanego materiału i różnych odczynników, a strumieniem cieczy, „odbierającej”, to jest roztworem, do którego następuje dyfuzja. W analizie automatycznej dializa zastępuje wszelkie czynności stosowane w metodzie manualnej dla oddzielenia różnych substancji jak wytrącanie, sączenie, destylowanie, ekstrakcje itp.



Rys. 2. Schemat przebiegu analizy automatycznej na przykładzie mocznika

Zależnie od charakteru błony półprzepuszczalnej, jedne składniki dyfundują do odbieralnika, inne nie (rysunek 2). Ilość przedyfundowanego składnika zależy od jego stężenia, czasu trwania dyfuzji, wielkości powierzchni dyfuzyjnej i temperatury. Jeżeli trzy ostatnie parametry są stałe, to ilość oddializowanej substancji będzie wprost proporcjonalna do jej stężenia w badanym roztworze.

Zwykle badany składnik nie zostaje całkowicie oddializowany do płynu odbierającego, na przykład przy oznaczaniu glukozy dyfunduje tylko około 9%, a przy oznaczaniu mocznika — przeciętnie 50%, jednakże procent ten musi być stały.

W analizie automatycznej stosuje się dwa rodzaje dializatorów: pojedynczy lub też zawierający dwie błony półprzepuszczalne, o mniejszych (typ B) i większych (typ C) porach.

Obie ciecz: dializowana i odbierająca po wyjściu z dializatora mogą być włączone w tok dalszego badania. Jeżeli program przewiduje oznaczenie składnika przedyfundowanego do cieczy odbierającej, wówczas ten właśnie strumień idzie do dalszej analizy, a drugi (górny na rysunku 2), zwykle przeprowadzony jeszcze przez pompę rozdzielczą, skiero-

wany zostaje do zlewu. Często jednak i w tym strumieniu oznacza się jeszcze inne składniki, które dyfundowały minimalnie lub wcale nie dyfundowały. Analizowany składnik dyfunduje bezpośrednio do odczynnika, z którym najczęściej daje od razu reakcję barwną, albo też reakcję wstępną do niej.

Łaźnia termostatowa. Strumień zawierający badany składnik po przejściu przez dializator idzie do termostatu, w którym następuje „dojrzewanie” reakcji barwnej. Temperatura i czas przepływu muszą być dostosowane do warunków tej reakcji. Termostat zapewnia również utrzymanie stałej temperatury przy kolorymetrowaniu.

Łaźnie termostatowe wypełnione są olejem — dla temperatury ponad 70°C , lub wodą — dla temperatury niższej. Zanurzony w nich układ rurek spiralnych ma długość przeważnie około 12 metrów i przekrój 1,6 do 1,8 mm. Czas potrzebny do przejścia przez nie strumienia wynosi około 5—8 minut.

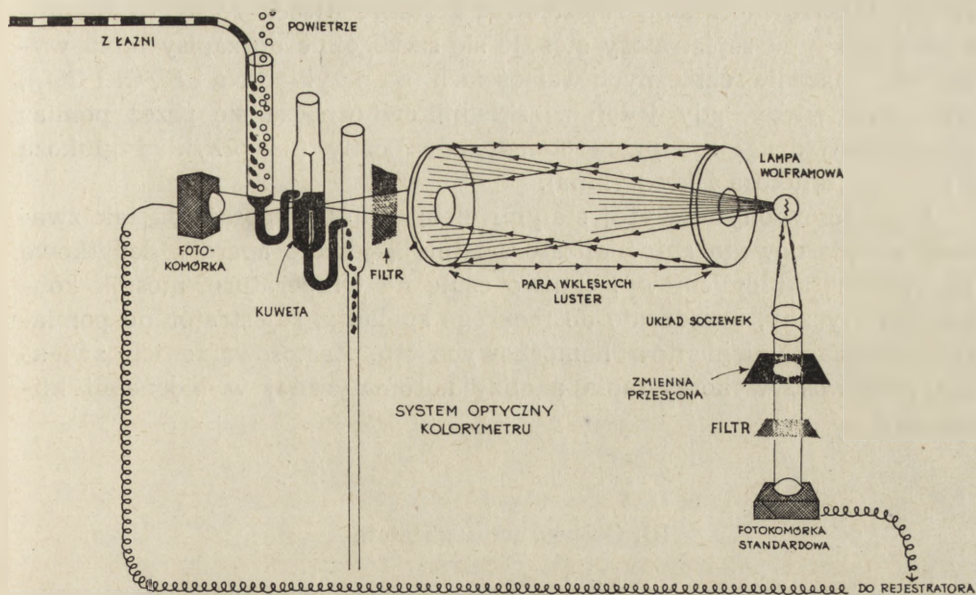
Kolorymetr wyposażony jest w dwa układy fotoelektryczne: źródło światła (lampa wolframowa) i układ pomiaru transmisji (rysunek 3), łącznik prądu i wymienne filtry. Nowszy typ ma dodatkowe urządzenie do regulacji punktu zerowego i maksymalnej transmisji przez zmianę natężenia prądu.

Najważniejszą częścią kolorymetru jest kuweta. Kuweta makro (rysunek 3) składa się z trzech połączonych ze sobą rurek szklanych, z których pierwsza służy do odpowietrzania strumienia, druga — do właściwego pomiaru kolorymetrycznego, trzecia — do ponownego segmentowania strumienia i odprowadzenia go na zewnątrz. Część, w którym odbywa się pomiar może mieć przekrój od 1 do 10 mm. Kuweta mikro składa się z jednego zespołu szklanego, a grubość warstwy kolorymetrowanej wynosi 15 mm (rysunek 4).

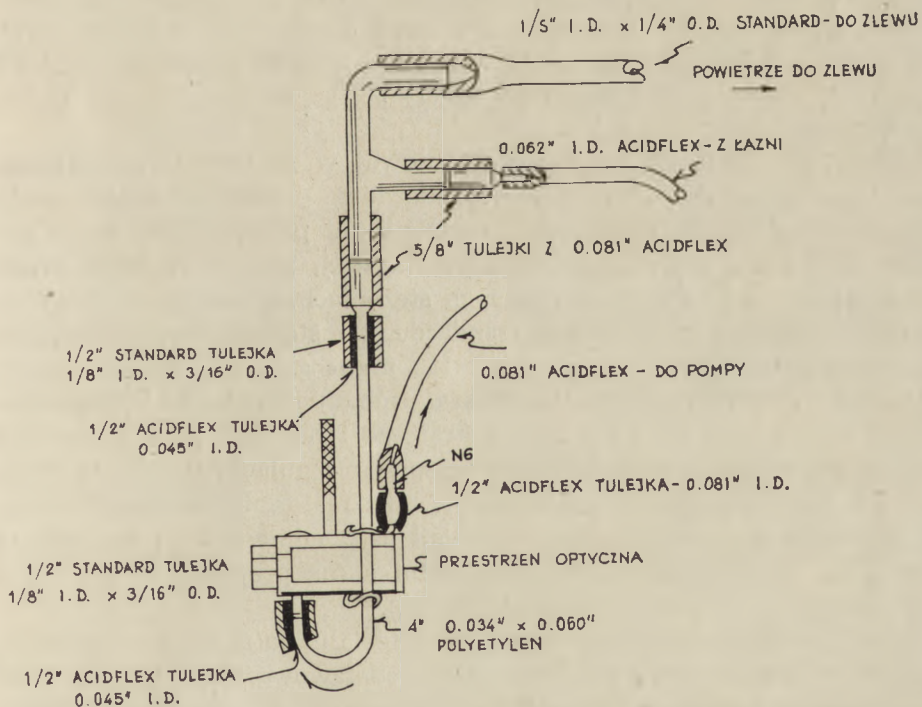
Rejestrator. Strumień światła przepuszczony przez warstwę badanej w kolorymetrze cieczy pada na odbieralnik fotoelektryczny reagujący zmianą natężenia prądu na różne nasilenie zabarwienia. Prąd ten, odpowiednio wzmocniony przetwarzany jest na energię mechaniczną potrzebną do uruchomienia pisaka.

Czułość rejestratora reguluje się tak, aby objęła ona skrajne wartości pomiaru badanego składnika. Jeżeli reakcja polega na tworzeniu się barwy, czyli zmniejszaniu transmisji (T), wówczas linia podstawowa powinna znajdować się w zakresie 95—100% T (pomiar bezpośredni). Jeżeli natomiast reakcja kolorymetryczna przebiega ze zwiększeniem się transmisji, czyli zabarwienie zanika ze wzrostem stężenia składnika badanego (na przykład glukozy, CO_2 , dehydrogenazy mleczanowej), wówczas linia podstawowa powinna znajdować się w zakresie 0—5% T (pomiar pośredni, albo odwrócony).

Rejestrator może być jedno- lub dwupisakowy. W dwupisakowym rejestratorze są dwa układy sprzężone z dwoma różnymi kolorymetrami,



Rys. 3. Schemat procesu kolorymetrowania



Rys. 4. Zasada budowy mikrokuwety w kolorymetrze autoanalizatora

co pozwala równocześnie rejestrować stężenie dwóch różnych składników. Tego typu rejestratory stosuje się szczególnie do zapisywania wyników o znacznie rozbieżnych wartościach (na przykład Na i K, Cl i CO₂), względnie wtedy, gdy jeden ze składników oznacza się przez pomiar bezpośredni drugi zaś przez pomiar odwrócony (na przykład glukoza i mocznik, glukoza i kreatynina).

Poza omówionymi wyżej stałymi elementami wyposażenia tak zwanego standardowego autoanalyzera istnieją jeszcze aparaty dodatkowe jak: fotometr płomieniowy, ogniwo czułe na temperaturę, mostek konduktometryczny, urządzenie do mokrego spalania, rejestrator do pomiaru aglutynacji elementów komórkowych itp. Zastosowanie ich zwiększa możliwość wykorzystania analizy automatycznej w biochemii klinicznej.

III. Obsługa autoanalyzera

Pompę rozdzielczą włącza się przez przyciśnięcie przewodów układem metalowych walców. Aparat przepłukuje się przez 15 minut wodą destylowaną lub rozcieńczonym kwasem solnym albo octowym, bądź też jeżeli wykonuje się zawsze tego samego rodzaju badania, od razu odczytnikami kontrolując szczelność połączeń. Następnie przewód przeznaczony do pobierania próbek umieszcza się w wodzie lub w innym płynie odniesienia, równocześnie włączając dializator, termostat i kolorymetr. Po dalszych 15 minutach włącza się rejestrator i ustala na nim linię podstawową.

Próbki ustawia się na tarczy obrotowej w następującej kolejności: najpierw conajmniej dwie próby standardowe o skrajnie dużych stężeniach celem ustalenia zakresu transmisji (na przykład 350 mg⁰/o glukozy, 300 mg⁰/o mocznika, 200mEq/l Na itp.), potem właściwe próbki standardowe o kolejno wzrastających stężeniach, a następnie próby badane przeplatane co 5 miejsc standardem o stężeniu odpowiadającym wartości prawidłowej (na przykład 100 mg⁰/o glukozy, 30 mg⁰/o mocznika, 20 mg⁰/o K itp.). Gdy pierwsza próba podejździe do kolorymetru, ustala się czułość pomiaru na rejestratorze i reguluje jego zakres (tak zwana linia maksymalnego pomiaru) przez regulację natężenia prądu lub zmianę rozcieńczenia odczytników albo materiału pobranego do badania. Aby zwiększyć zakres transmisji płyn odniesienia przygotowuje się często z dodatkiem badanego składnika (na przykład 50 mg⁰/o glukozy, 10 mg⁰/o mocznika, 50 mEq/l Na itp.).

Od chwili ukończenia pobierania materiału należy odczekać aż rejestrator zacznie znowu wykreślać linię podstawową, gdyż dopiero wtedy analiza jest skończona. Uzyskane krzywe ocenia się porównując z krzywą standardową.

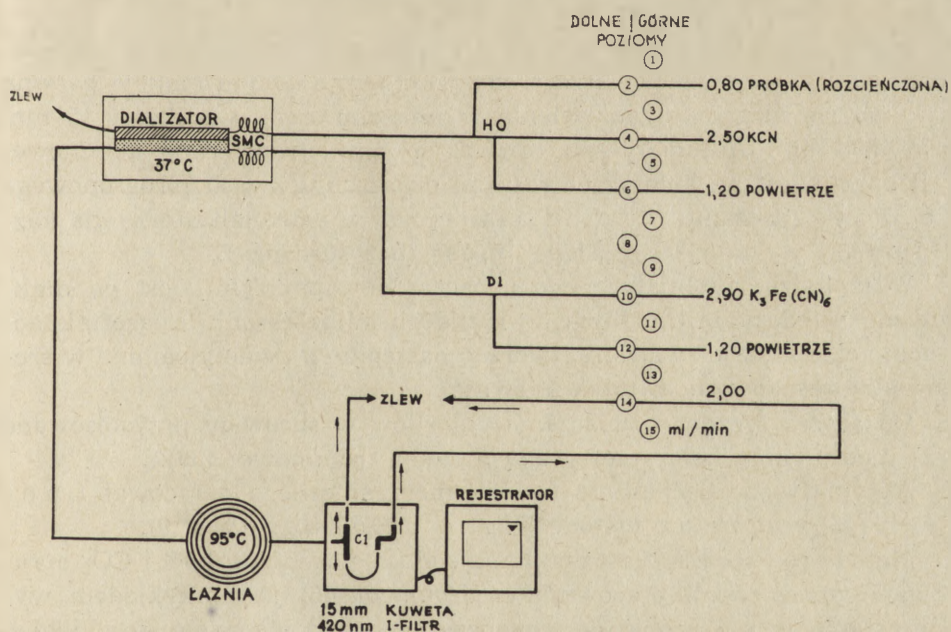
Badanie za pomocą autoanalizatora jest opłacalne gdy ilość analiz jest większa niż 20, a przy gotowym zestawie odczynników — gdy wynosi ona co najmniej 10. W niektórych laboratoriach posiadających wiele autoanalizatorów stosuje się je również przy mniejszej liczbie analiz, aby otrzymać rejestrację wyników dla celów dokumentacyjnych. Autoanalizatory wymagają stałego nadzoru technicznego ze strony specjalnie wyszkolonego pracownika, to też tym bardziej się opłacają, im więcej jest ich w laboratorium.

IV. Omówienie niektórych metod

Wiele metod używanych w biochemii klinicznej przystosowano już do wykonania za pomocą autoanalizatorów.

Automatyczne oznaczanie glukozy we krwi, lub w płynie mózgowo-rdzeniowym (10, 14) oparte jest na opisanej w roku 1937 metodzie redukcyjnej (13), która — ze względu na niebezpieczeństwo kontaktu z KCN — nie była w użyciu. Próbkę rocieńcza się roztworem fizjologicznym soli. Strumień odbierający podczas dializy zawiera żelazicyjanek potasu i KCN (rysunek 5). Zmianę zabarwienia żelazicyjanu pod wpływem redukującego działania glukozy mierzy się przy 420 nm (mikrokuweta 15 mm).

Automatyczne oznaczanie mocznika (31) w oparciu o metodę Marshalla i wsp. (21). Mocznik dyfunduje do roztworu zawierającego dwuace-



Rys. 5. Schemat automatycznego oznaczania glukozy (60 oznaczeń/godzinę)

tylomonooksym, alun żelazowo-amonowy oraz kwasy siarkowy i fosforowy. W temperaturze 95° dwuacetylomonooksym hydrolizuje do dwuacetylu, dającego z mocznikiem reakcję barwną.

Automatyczne oznaczanie cholesterolu za pomocą autoanalizatora (17, 18), oparte jest na metodzie (40), według której w obecności stężonego kwasu siarkowego i kwasu octowego tworzy się kompleks barwny z FeCl_3 . Do analizy stosuje się przygotowany ręcznie wyciąg izopropanolowy surowicy (1:10).

Hemoglobinę oznacza się automatycznie (12) na znanej zasadzie utleniania jej żelazicyjankiem potasu a następnie przeprowadzeniu w cyjanohemoglobinę.

Ilościową metodę automatycznego oznaczania albumin polegającą na reakcji barwnej z kwasem 2-(4-hydroksybenzeno)-benzoesowym (HABA) opracował Stevens (34) w oparciu o metodę Nutsteina i wsp. (27) oraz Wrema i Fleischmeira (37). Stosując odczynnik biuretowy w oparciu o metodę Wechselbauma (35) można według tego samego programu oznaczyć białko całkowite.

Do automatycznego oznaczania fosfatazy kwaśnej przystosowano (28) metodę Powella i Smitha (23). Na podobnej zasadzie oparta jest też metoda automatycznego oznaczania fosfatazy zasadowej (20).

Automatyczne oznaczanie aminotransferazy asparaginianowej (20) opiera się na metodzie Babsona (1). Zasadą jej jest reakcja barwna powstającego pod działaniem enzymu kwasu aceto-octowego z solą sodową chlorku 6-benzamido-4-metylooksym-toluidyno-dwuazowego (tak zwany *Azoene Fast Violet B*). (rysunek 6).

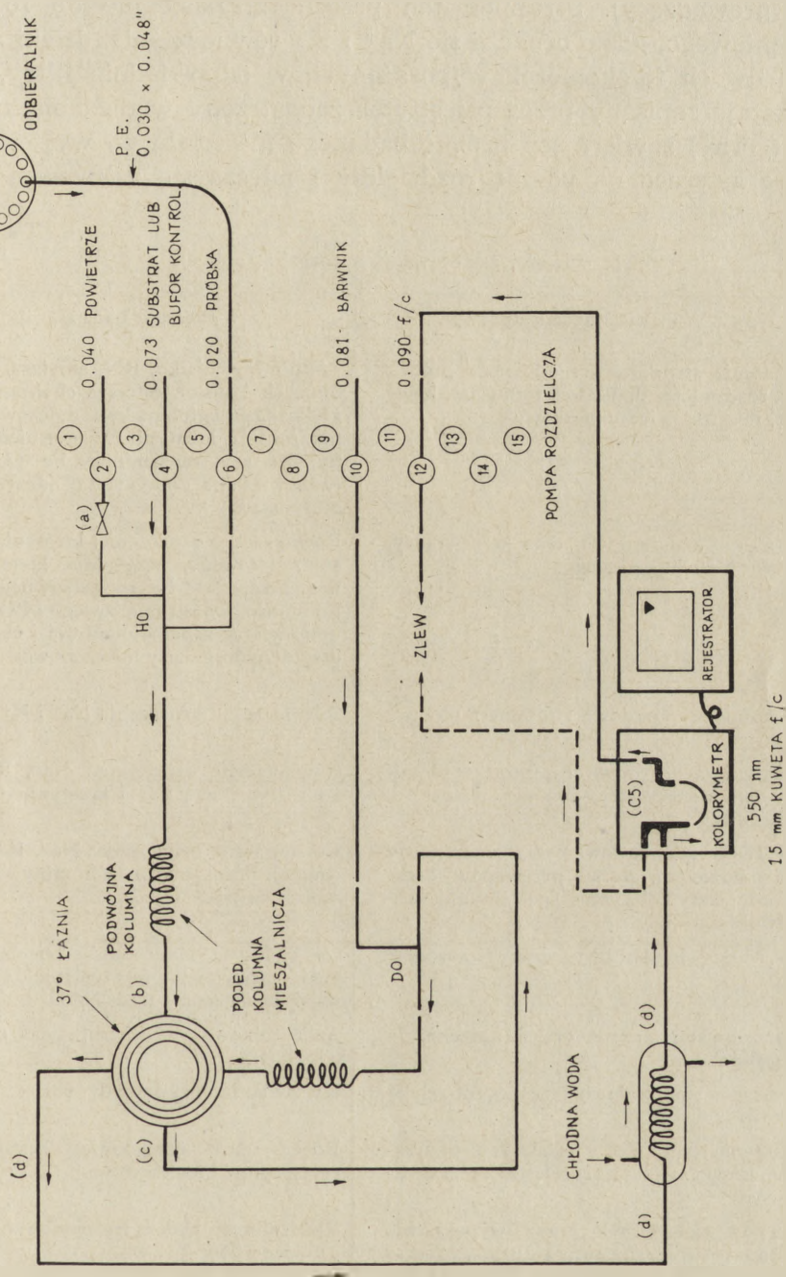
Próbki surowicy inkubuje się z substratem w termostacie o temperaturze 37°C, a następnie miesza z odczynnikami dającym reakcję barwną i ocenia się natężenie zabarwienia w mikrokuwecie o grubości 15 mm przy 550 nm. Automatyczne oznaczanie aminotransferazy alaninowej (30) oparte jest na kolorymetrycznym oznaczaniu kwasu pirogronowego (25). Przy oznaczaniu fosfatyz i transaminaz w autoanalizatorze dla każdej próbki wykonuje się „ślepa” próbę (bez surowicy).

W metodzie automatycznego oznaczania wapnia (16), jest on dializowany w odczynie kwaśnym do roztworu kompleksonu kreasoftaleinowego, gdzie zostaje związany, tworząc następnie z dwuetyloaminą w środowisku zasadowym związek barwny.

Do automatycznego oznaczania chlorków w surowicy przystosowano (32) modyfikację kolorymetryczną metody rodankowej (39).

Automatyczne oznaczanie fosforu nieorganicznego opracował Lungen (19) w oparciu o metodę Fiske i Subbarowa (9).

Metoda równoczesnego oznaczania sodu, potasu, chlorków i CO_2 opracowana przez zespół pracowników *Technicon* (6) jest przykładem wykorzystania jednej próbki do równoczesnego badania wielu składników. Odpowiednio rozcieńczony materiał przechodzi przez dializator — gdzie



Rys. 6. Schemat automatycznego oznaczania aminotransferazy asparaginowej

Na^+ i K^+ dyfundują do strumienia odbierającego, który zawiera określony skład elektrolitów (podwyższony próg dla Na^+ i sole litu jako element prowadzący). Strumień ten przechodzi następnie do fotometru płomieniowego, gdzie oznacza się Na^+ i K^+ równocześnie, dzięki zastosowaniu dwóch fotokomórek wyposażonych w odpowiednie filtry, a wynik zostaje zapisany przez rejestrator zaopatrzonego w dwa pisaki. Strumień (górny) zawierający próbkę badanego materiału po wyjściu z dializatora zawraca na pompę rozdzielczą i miesza się z kwasem siarko-

Tablica 2

Możliwości zastosowania autoanalizatorów

Wyposażenie aparaturowe	Rodzaje badań
Wyposażenie standardowe: odbieracz próbek pompa rozdzielcza, dializator, termostat, kolorymetr, rejestrator jednopisakowy	Albuminy, białko, RN, amylaza, bilirubina, cholesterol, esteraza cholinowa, CO glukoza, hemoglobina, kwas moczowy, mocznik, inulina, kreatynina, fosfor nieorganiczny, fosfatazy, transaminazy, Fe^{3+} , Cu^{2+} , odczyn wiązania dopełniacza, odczyn hemaglutynacyjny
Wyposażenie standardowe, dwa kolorymetry, rejestrator z dwoma pisakami	Równoczesne oznaczenie: kreatyniny, kwasu moczowego, względnie kreatyniny i mocznika, Ca^{2+} i PO_4^{3-} całkowitego białka i albumin, kwasu moczowego i PO_4^{3-} , aminotransferaz asparaginianowej i alaninowej oraz dehydrogenazy mleczanowej
Wyposażenie standardowe i fotometr płomieniowy	Równoczesne oznaczenia Na^+ i K^+
Wyposażenie standardowe oraz fotometr płomieniowy, dwa kolorymetry, dwa rejestratory dwupisakowe	Równoczesne oznaczenie: Na^+ , K^+ , CO i Cl^- Na^+ , K^+ , Cl^- i kreatyniny
Wyposażenie standardowe oraz dodatkowo: pompa rozdzielcza, zestaw przewodów, dializator, termostaty, kolorymetr specjalny, rejestratory dwupisakowe	Równoczesne oznaczenie: Na^+ , K^+ , CO ⁻ , ogólnej ilości białka, albuminy, glukozy, mocznika itp.
Wyposażenie standardowe oraz fluorymetr	Ca^{2+} , Mg^{2+} , cholesterol, katecholaminy, kwas salicylowy, fenyloalanina i enzymy współdziałające ze zred NAD
Wyposażenie standardowe oraz urządzenie do mokrego spalania	Azot całkowity (Kjeldahl), jod związany z białkiem
Wyposażenie standardowe i zestaw do chromatografii	Kwasy aminowe, peptydy, cukry
Wyposażenie standardowe z dodatkowym urządzeniem liczącym komórki i rejestratorem dwupisakowym	Równoczesne oznaczanie: hemoglobiny, erytrocytów i leukocytów
Aparat do elektroforezy oraz wyposażenie standardowe autoanalizatora z dwoma programami, z dwiema pompami rozdzielczymi, kamerą z odpowiednim układem optycznym z rejestratorem i integratorem	Elektroforeza białek, frakcjonowanie białek i nukleotydów
Odbieralnik, dwie pompy rozdzielcze układ kolumn mieszalniczych, dekantatory, urządzenie do rejestrowania na bibule	Oznaczenie grup i podgrup krwi

wym. Wyzwalający się CO_2 adsorbuje się w roztworze NaOH zabarwionym fenoloftaleiną. Stopień jej odbarwienia oceniany za pomocą kolorymetru I i zapisany na rejestratorze II jest miarą tej adsorpcji, czyli ilości wydzielonego CO_2 . Następnie strumień poddany zostaje ponownej dializie przy użyciu błony półprzepuszczalnej o innym wymiarze porów. Wówczas dyfundują chlorki do cieczy odbierającej, która zawiera odczynnik dający z nimi reakcję barwną. Ocenia się ją przy użyciu kolorymetru II i zapisuje na rejestratorze II — z dwoma pisakami, dla CO_2 i Cl . Ostatnio opracowano modyfikację tej metody umożliwiającą oznaczanie również wapnia (3).

Opisano także interesujące metody automatycznego oznaczania żelaza (38), kreatyniny w moczu (2), stopnia aglutynacji krwinek czerwonych, oznaczania grup krwi (26), czasu krzepnięcia i innych testów serologicznych, a wprowadzenie przystawki fluorymetrycznej pozwoliło dostosować do analizy automatycznej oznaczanie wapnia, magnezu, fenylalaniny, katecholamin transaminaz, dehydrogenazy mleczanowej i wielu innych enzymów (41). Obecnie już prawie wszystkie metody stosowane rutynowo w laboratorium klinicznym zostały zaadoptowane do autoanalizatorów.

Firma *Technicon* organizuje sympozja poświęcone najnowszym osiągnięciom lub ściśle określonym zagadnieniom z dziedziny analizy automatycznej. W 1966 roku omówiono w Londynie automatyczne metody badania aminokwasów, a sympozja w Nowym Jorku i w Paryżu były przeglądem najnowszych osiągnięć w dziedzinie analizy automatycznej — nie tylko w biochemii klinicznej — ale również w chemii farmaceutycznej, przemysłowej, rolnej i w biochemii mikroorganizmów. O aktualnych możliwościach wykorzystania autoanalizatorów w praktyce laboratoryjnej najlepiej zorientuje tablica 2.

V. Perspektywy

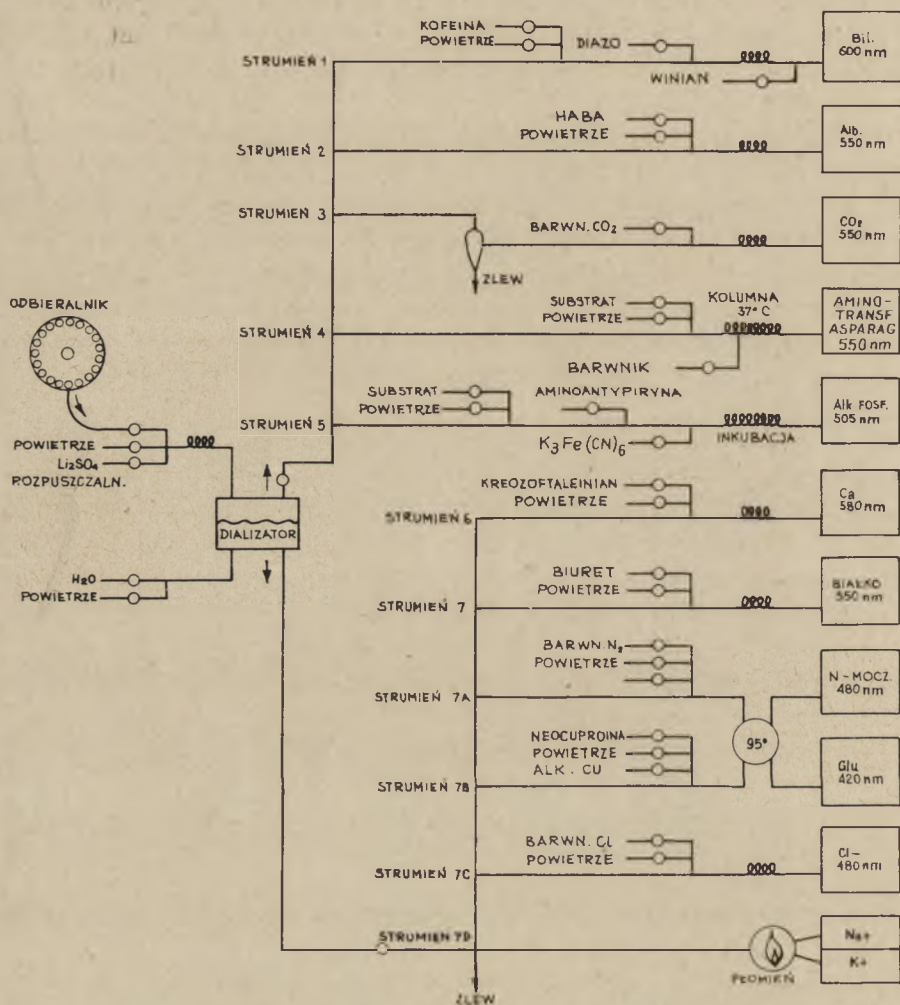
Postęp w dziedzinie aparatury laboratoryjnej gwałtownie zmierza w kierunku automatyzacji badań, trudno jednak przewidzieć czy zdoła on zahamować narastające dysproporcje między potrzebami a możliwościami prowadzenia badań w laboratoriach klinicznych.

Ulepszenia autoanalizatorów polegają na zwiększeniu ilości oznaczeń z jednej próbki oraz jeszcze pełniejszym zautomatyzowaniu czynności.

W roku 1964 Skeggs i Hochstrasser tak dobrali zestaw aparatów do autoanalizatora, że można nim było wykonać 8 różnych oznaczeń z jednej próbki, a Whitehead (41) udoskonalił ten system przystosowując go do 12 oznaczeń (*SMA-12 = Segmental Multiple Autoanalyser*) (rysunek 7). Kolorymetr tego urządzenia pozwala oceniać równocześnie

12 próbek w różnych zakresach widma, a wyniki zostają zapisane na papierze o takiej kalibracji, że można je bezpośrednio odczytać. Wydajność SMA-12 wynosi 1200 oznaczeń na 8 godzin.

Są też możliwości zastąpienia zapisu graficznego zapisem cyfrowym. Wyniki otrzymane metodą automatyczną przenosi się na taśmę lub kartę dziurkowaną, która wraz z inną dokumentacją chorego zostaje przeka-



Rys. 7. Schemat automatycznego oznaczania równocześnie 12 różnych składników (41)

zana elektronicznej maszynie matematycznej do „zapamiętania”. Wprowadzenie maszyn matematycznych otwiera nowe perspektywy rozwojowe — nie tylko dla laboratorium, ale i dla szpitali.

Ostatni VI Kongres Chemii Klinicznej w Monachium, a jeszcze bardziej Międzynarodowa Wystawa Laboratoryjnej Techniki Pomiarowej w Chemii (ILMAC) w Bazylei, które odbyły się w 1966 r. były okazją do

pokazania najnowszych osiągnięć w dziedzinie automatycznej aparatury laboratoryjnej. Aparaty oferowane przez amerykańską firmę *Joyce-Loebl* oparte były na nieco innej zasadzie niż autoanalizatory *Technicon*. Przedstawiono między innymi aparat o nazwie *Chromoscan-Dubosnam*, który służy do automatycznego pomiaru szybkości reakcji przebiegającej w 15 różnych próbkach umieszczonych na obrotowym bębnie. Napęlnianie, przepłukiwanie i opróżnianie kuwet jest całkowicie automatyczne, a wyniki zapisuje się graficznie. Aparat ten przystosowany jest również do badań w ultrafiolecie. Inny aparat tej firmy pod nazwą *Mecolab* zbudowany podobnie, ma dodatkowe urządzenia; najważniejszym jest elektronowa maszyna licząca, umożliwiająca zapis w postaci dziurkowanej taśmy lub cyfrowy. Zapis graficzny służy w tym typie automatycznej analizy jedynie dla celów kontrolnych. Cyfrowy zapis jest dwubarwny. Można dowolnie dobierać kolor, na przykład czarny dla prób badanych, a czerwony dla standardów, lub czarny — dla wyników fizjologicznych, a czerwony dla patologicznych. Wydajność *Mecolabu* wynosi 300 analiz na godzinę. Ta wydajność jednak w wielu wypadkach nie jest wystarczająca. W związku z coraz większym rozwojem chromatografii istnieje zapotrzebowanie w laboratorium biochemicznym na aparaty o wydajności paru tysięcy próbek na godzinę.

Można już teraz wyobrazić sobie, że za parę lat laboratorium kliniczne zmieni zupełnie swój wygląd oraz rodzaj zatrudnionych pracowników. Będzie coraz bardziej przypominało stację dyspozytorską. Aparatura automatyczna, coraz bardziej wydajna, jest też coraz bardziej skomplikowana i wymaga obsługi przez pracowników z wykształceniem technicznym. Firma *Boehringer* zachęca do robienia co pewien czas zdjęć laboratoriów dla przekonania się, jak szybko i jak dalece zmieniają one swój wygląd. Nie należy jednak zapominać, że ciągle unowocześnianie laboratoriów pociąga za sobą bardzo wielkie koszty.

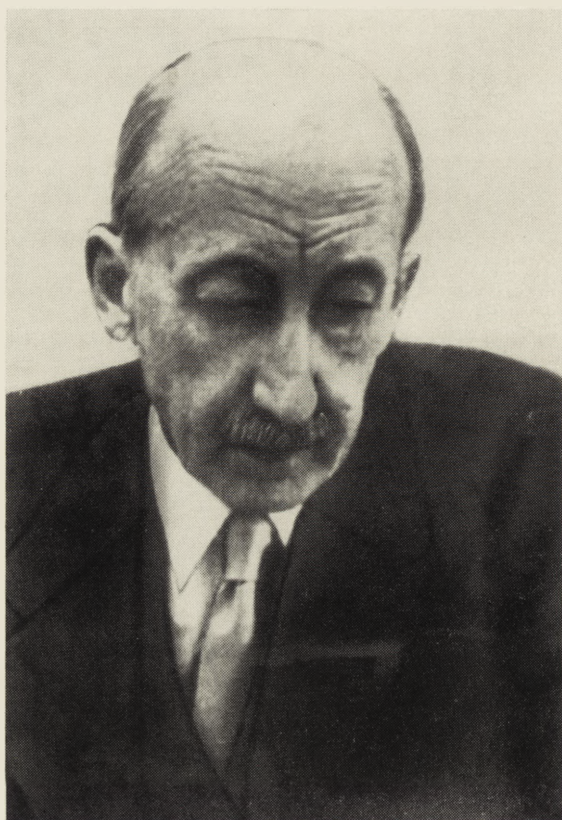
LITERATURA

1. Babson A. L., *Clin. Chim. Acta* 7, 109 (1962).
2. Bittles A. H., Bell J. F., Neill D. W., *J. Clin. Pathol.* 18, 377 (1965).
3. Bold A. M., Hurst R. J., Mc Swiney R. R., *J. Clin. Pathol.* 18, 240 (1965).
4. Cash J. D., Leask E., *J. Clin. Pathol.* 18, 821 (1965).
5. Crandall W. A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 87, 911 (1960).
6. Electrolytes Determination Notes N-21-a. Technicon Instr. Co 1965.
7. Ferrari A., Kessel G., Russo-Alesi P. M., Kelly J. M., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 87, 729 (1960).
8. Ferrari A., Russo-Alesi F. M., Kelly J. H., *Anal. Chem.* 31, 1710 (1959).
9. Fiske C. H., Subbarow I., *J. Biol. Chem.* 66, 375 (1925).
10. Gredy J. H., Lamar A. M., *Clin Chem.* 5, 542 (1959).
11. Grenfell T. C., McLanghbin D. J., Kelly J. M., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 87, 857 (1960).

12. Hemoglobin Determination, Notes N-18, Technicon Instr., Co 1964.
13. Hoffman W. S., *J. Biol. Chem.* **120**, 51 (1937).
14. Johnson J., *Amer. J. Med. Techn.* **5**, 271 (1958).
15. Joyce-Loeb Information 1966, Nr 3.
16. Kessler G., Wolfmann M., Calcium methodology Notes N-3, Technicon Instr. Co 1964.
17. Leffler H. H., *Amer. J. Clin. Pathol.* **31**, 310 (1959).
18. Levine J., Zak B., *Clin. Chim. Acta* **10**, 381 (1964).
19. Lungren D. P., *Anal. Chem.* **32**, 824 (1960).
20. Marsh W. H., Fingerhut B., Kirsch E., *Amer. J. Clin. Pathol.* **28**, 681 (1957).
21. Marsh W. H., Fingerhut B., Kirsch E., *Clin. Chem.* **5**, 119 (1959).
22. Müller R. H. *Anal. Chem.* **30**, 53A (1958).
23. Powell M. E. A., Smith J. H., *J. Clin. Pathol.* **7**, 245 (1954).
24. Reinhardt C., Hardwick P., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **87**, 883 (1960).
25. Reitman S., Frankel S., *Am. J. Clin. Pathol.* **28**, 56 (1957).
26. Rosenfield R. E., Haber G. V., Detection and Measurement of Hemoglobin, Notes N-44p, Technicon Instr. Co, 1964.
27. Rutstein D. D., Ingemto E. F., Regnolds W. E., *J. Clin. Invest.* **33**, 24 (1954).
- logous Human Hemagglutinations. N. Y. City Depart. of Health, Technicon Symposium 1965.
28. Schwarz N. K., Kessler G., Bodansky O., Acide Phosphatase Methodology, Technicon Instr. Co., Note N-6, 1964.
29. Serum Glutamic-Oxalacetic, Transaminase Methodology Notes N-25p, Technicon Instr. Co, 1964.
30. Serum-Glutamic-Pyruvic Transaminase (GPT), Notes N-44p. Technicon Instr. Co, 1964.
31. Skeggs L. T. Jr., *Amer. J. Clin. Pathol.* **28**, 311 (1957).
32. Skeggs J., Chlorid methodology in serum. Notes N-5a, Technicon Instr. Co, 1963.
33. Stevens D. L., Total Protein Methodology. Notes N-14a. Technicon Instr., Co, 1964.
34. Stevens D. L., Albumin Methodology, Notes N-15-a. Technicon Instr. Co, 1964.
35. Wechselbaum T. E., *Amer. J. Clin. Pathol.* **7**, 40 (1946).
36. Weller C., Linder M., Mc Anlay A., Ferrari A., Kessler C., *Clin. Res.* **8**, 28 (1960).
37. Wrem R. T., Fleischmeir T. W., *Techn. Bull. Reg. Med. Techn.* **26**, 174 (1956).
38. Young D. S., Hicks J. M., *J. Clin. Pathol.* **18**, 98 (1965).
39. Zall D. M., Fisher D., Garner M. O., *Nat. Chem.* **28**, 1665 (1956).
40. Zlatkin A., Zak B., Boyle A. J., *J. Labor. Clin. Med.* **41**, 486 (1963).
41. Zbiór referatów 3 symposium (3 Symposiumsband Automation in der Analytischen Chemie) Technicon GmbH, Frankfurt 1966.

Do napisania niniejszego artykułu przyczynił się pan docent dr H. Rosenmund, który w kierowanym przez siebie Centralnym Laboratorium Szpitala Klinicznego w Zurychu pomógł mi dokładnie zapoznać się z automatyzacją w biochemii klinicznej. Składam mu za to serdeczne podziękowanie.

AUTOR



WŁODZIMIERZ OSTROWSKI*

George Hevesy

Twórca metod izotopowych w badaniach biochemicznych

Zastosowanie izotopów jako znaczników w badaniach procesów chemicznych, biochemicznych oraz w medycynie klinicznej jest ściśle związane z życiem i działalnością naukową prof. George Hevesy'ego. Historia kariery naukowej tego badacza pełna była ciągłych niepowodzeń, które jednak zawsze stawały się początkiem sukcesu naukowego. Po latach tych zmagañ, Hevesy otrzymuje nagrodę Nobla za rok 1943 „za pracę nad zastosowaniem izotopów jako znaczników w badaniach procesów chemicznych”.

Urodził się w Budapeszcie 1 sierpnia 1885 r. jako syn urzędnika dworu cesarskiego. Studiuję najpierw na Uniwersytecie w Budapeszcie, następnie na Politechnice w Berlinie i kończy studia we Fryburgu w 1908 r., gdzie otrzymuje stopień doktora nauk przyrodniczych. Przez dwa lata jest asystentem na Politechnice w Zurychu u Ryszarda Lorenza, a potem odbywa krótki staż u Fritza Habera w Karlsruhe. W 1911 r. udaje się do laboratorium Ernesta Rutherforda na Uniwersytecie w Manchester, gdzie jako temat pracy otrzymuje zadanie rozdzielenia radu D (^{210}Pb) od dużych ilości trwałego izotopu ołowiu. Po wielu miesiącach bezowocnych prób Hevesy stwierdził, że rozwiązanie tego zagadnienia jest niemożliwe, gdyż rad D ma takie same własności chemiczne jak zwykły ołów — sam bowiem rad D, o masie 210, jest tylko izotopem ołowiu. Podczas tych doświadczeń zrodziła się u Hevesy'ego koncepcja śledzenia procesów chemicznych przy użyciu związków znakowanych izotopami radioaktywnymi, lub różniącymi się masą izotopów stałych. W ten sposób Hevesy opracowuje nową metodę badania procesów chemicznych i biologicznych — metodę rozcieńczenia izotopowego — później znacznie rozwiniętą przez samego autora (1) i powszechnie dziś stosowaną przy badaniu procesów metabolicznych. W 1913 r. Hevesy otrzymuje stanowisko wykładowcy na Uniwersytecie w Budapeszcie, kontynuując równocześnie swoje badania w zakresie chemii nieorganicznej i fizycznej w Instytucie Radowym w Wiedniu. Tu wraz z F. Panethem przeprowadza

* Doc. dr, Kierownik Katedry Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Krakowie.

klasyczne badania nad rozpuszczalnością soli oraz szybkością wymiany atomów pomiędzy ciałami stałymi i roztworami. Badania te uczeni przeprowadzali już przy użyciu naturalnych radioaktywnych izotopów Pb i Bi jako znaczników.

Podczas I Wojny Światowej Hevesy odbywał służbę wojskową w armii austrowęgierskiej biorąc udział w licznych kampaniach wojennych. Po zakończeniu wojny zostaje mianowany profesorem na Uniwersytecie Budapeszteńskim, ale po dwu latach pracy na tym stanowisku opuszcza Węgry i udaje się do Laboratorium Nielsa Bohra w Kopenhadze. Przy współpracy z Brönstedem osiąga preparatywny rozdział izotopów rtęci oraz chloru. Bada wymianę atomów pomiędzy dwoma różnymi związkami ołowiu — ołów z chlorku ołowiu wymienia się z Pb w azotanie ołowiu, czyli między solami czterowartościowego ołowiu; natomiast zupełnie nie ulega wymianie z takiego połączenia jak czterowartościowy ołów (2). Podobnie nie ulega wymianie atom fosforu pomiędzy kwasem fosforowym a jego organicznymi estrami (3, 4). W 1922 r. Coster i Hevesy wykryli nieznany dotychczas pierwiastek należący do szeregu cyrkonu i toru o liczbie porządkowej 72 i nazwali go hafnem. Hafn występuje w minerałach cyrkonowych w niezmiernie drobnych ilościach i został najpierw odkryty, zgodnie z teorią Moseleya, na podstawie widma rentgenowskiego. Oddzielenie hafnu od cyrkonu z uwagi na duże podobieństwo ich własności było jednym z najtrudniejszych zagadnień chemii nieorganicznej. Dokonano tego przez wielokrotną krystalizację cząstkową podwójnych fluorków: $(\text{NH}_4)_2\text{ZrF}_6$ i $(\text{NH}_4)_2\text{HfF}_6$, jako że ten ostatni nieco łatwiej rozpuszcza się w wodzie.

Następny rok, 1923, był również szczęśliwy dla Hevesy'ego. Przeprowadza słynny eksperyment nad absorpcją i rozmieszczeniem toru B (radioaktywny izotop ołowiu) w organizmie roślinnym (5), który stał się klasycznym przykładem zastosowania izotopów w badaniach biologicznych. Korzenie fasoli zanurzył w roztworze o określonym stężeniu toru B w postaci azotanu ołowiu. Od rośliny oddzielił następnie korzenie, łodygę i liście i za pomocą elektroskopu mierzył w nich natężenie radioaktywności. Zmieniało się ono w zależności od stężenia radioaktywnego azotanu ołowiu w środowisku zewnętrznym. Następnie przeniósł znakowaną roślinę do roztworu nieaktywnego azotanu ołowiu, zawierającego znacznie więcej Pb niż środowisko z torem B i po pewnym czasie stwierdził, że praktycznie cała radioaktywność rośliny przeszła do roztworu zewnętrznego. Zaszła zatem wymiana Pb radioaktywnego z nieradioaktywnym, podobnie jak i innych soli zawartych w roślinie. Ta część doświadczenia Hevesy'ego była później punktem wyjścia dla badań R. Schoenheimera i D. Rittenberga nad dynamicznym stanem składników ustroju, koncepcją, która miała ogromne znaczenie w biochemii dla zrozumienia stałości wewnętrznej organizacji ustroju i utrzymujących ją mechanizmów.

Inny eksperyment przeprowadzony przez Hevesy'ego, a nie opisany w literaturze naukowej, świadczy o bardziej praktycznym umyśle badacza. Przez pewien czas jadał w stołówce, w której jakoś podawanych potraw budziła w nim podejrzliwość. Pewnego dnia przyszedł na obiad z drobną ilością radioaktywnej substancji i posypał nią kawałek mięsa, który pozostawił na talerzu. Następnego dnia usiadł przy tym samym stole, ale uzbrojony w licznik Geigera. Kiedy podano mu jakieś danie mięsne, bez trudności stwierdził, że otrzymał potrawę z tego samego kawałka mięsa, które poprzedniego dnia pozostawił na talerzu. Oczywiście Hevesy zmienił miejsce stołowania się.

W następnych latach Hevesy publikuje szereg dalszych badań nad metabolizmem, absorpcją, rozmieszczeniem, wydalaniem ołowiu, bizmutu i toru w tkankach zwierzęcych (6, 7, 8). Badania te były rzecz prosta ograniczone tylko do naturalnych izotopów radioaktywnych cięższych pierwiastków, których nie było wówczas zbyt wiele i w badaniach biologicznych nie przedstawiały szczególniejszego znaczenia.

W 1926 r. Hevesy został mianowany profesorem chemii fizycznej na Uniwersytecie we Fryburgu i pozostawał na tym stanowisku do 1934 r. Potem powrócił do Instytutu Bohra i z 3-letnią przerwą w okresie II Wojny Światowej przebywał tam do 1952 r.

W 1913 r. Hevesy będąc przejazdem w Manchester i pijąc herbatę w towarzystwie Moseleya rzucił uwagę, że byłoby bardzo interesującym zbadać losy cząsteczek wody po dostaniu się ich do organizmu z przewodu pokarmowego. Moseley dość sceptycznie się zapatrywał na możliwość przeprowadzenia takiego doświadczenia, jako że wówczas nie znano izotopów wodoru ani tlenu, którymi by można znaczyć cząsteczki wody. Ale upłynęło zaledwie 20 lat i Hevesy publikuje w 1934 r. ważne prace nad zastosowaniem ciężkiego wodoru w badaniach metabolicznych (9, 10, 31), dotyczące zwłaszcza stosowania metody rozcieńczenia izotopowego dla określania przestrzeni ciała (*body compartments*) oraz szybkości ustalania się równowagi pomiędzy wodą podaną a wodą przestrzeni pozakomórkowej (11). Badania Hevesy'ego, Hahna i Jacobsena (12, 13) wykazały, że równowaga ta ustala się już w ciągu kilku minut, podczas gdy wymieszanie się z całą wodą ustroju zachodzi w ciągu około godziny. Wyjaśnienie tego zagadnienia stało się możliwe dzięki badaniom H. C. Urey'a w 1931 r., który odkrył deuter, a następnie ciężki azot — ^{15}N .

Otrzymanie sztucznych izotopów radioaktywnych przez małżeństwo Joliot-Curie w 1934 r. dzięki zastosowaniu neutronów ze źródła radoberylowego, rozpoczęło właściwą erę badań biologicznych przy użyciu atomów znaczonych, a liderem grupy badaczy stosujących tę metodę był Hevesy. Po otrzymaniu pierwszych, śladowych ilości ^{32}P , publikuje w 1935 r. wraz z Chievitzem wyniki badań nad przemianą tego pierwiastka w organizmie zwierzęcym (14, 32). Następnie współpracując z polskimi biochemikami Parnasem i Baranowskim przeprowadza kla-

syczne badania przemian cukrowych i tak zwanego końcowego cyklu spalań w komórce przy użyciu radioaktywnego fosforu (15, 16). Za pomocą tego samego izotopu i znakowanego octanu bada przemianę tłuszczów, wykazując, że składniki fosfatydów — zasady organiczne, kwasy tłuszczowe i kwas fosforowy — mają różny czas odnowy, choć cała cząsteczka fosfolipidowa charakteryzuje się również określonym czasem biologicznego trwania w organizmie. Wprowadza pojęcie biologicznego okresu życia pierwiastków i związków chemicznych oraz pojęcie czasu odnowy, które to zagadnienia mają pierwszorzędne znaczenie w badaniach metabolicznych współczesnej biochemii (17, 18, 19).

W tym czasie i w następnych latach Hevesy przeprowadza wiele istotnych doświadczeń ze znakowanymi substancjami w zakresie dynamicznych procesów żywego ustroju. Wprowadza radioaktywny fosfor do określenia czasu odnowy kwasów nukleinowych (20, 21). Wykazuje między innymi, że RNA wątroby jest metabolicznie około 33 razy bardziej aktywny niż DNA w tym samym narządzie (22). Stwierdza również, że RNA jądra komórkowego o wiele szybciej wbudowuje ^{32}P niż RNA innych frakcji komórki. Wbudowywanie fosforanu oraz adeniny do RNA wątroby rosnących zwierząt jest znacznie żywsze niż zwierząt dojrzałych (23).

Wraz z Hansem Eulerem, z którym bardzo ściśle współpracuje przez ostatnie 10 lat swego życia, bada syntezę kwasów nukleinowych w tkankach nowotworowych (24, 25), wpływ promieniowania X na organizmy żywe (26), wpływ formy podanego izotopu na jego aktywność biologiczną (21) i rozwiązuje wiele innych zagadnień biochemicznych. Konstrukcja cyklotronu w 1932 r. przez E. O. Lawrence'a, a w 10 lat później uruchomienie pierwszego reaktora atomowego przez E. Fermiego i jego współpracowników spowodowało znaczne zwiększenie asortymentu izotopów, które mogły być wykorzystane w badaniach biologicznych. Hevesy szeroko opracowuje zdolność wymiany i odkładania Ca w kościach zwierząt laboratoryjnych stwierdzając, że aktywność właściwa wydalanego wapnia stopniowo wzrasta po podaniu nieaktywnego izotopu, ale radioaktywny wapń w kości zasadniczo nie może być całkowicie wymieniony (27). Również sód kości, stanowiący około 20—25% tego pierwiastka całości ustroju, prawie nie ulega wymianie (28). Następnie Hevesy zajmuje się między innymi takimi zagadnieniami, jak określanie czasu życia erytrocytów na podstawie niskiej aktywności metabolicznej DNA (29), otrzymuje biosyntetycznie hemoglobinę znakowaną ^{59}Fe (21), bada przemianę żelaza w organizmie dojrzałym i u płodu (30).

Do końca swego życia — zmarł 5 lipca 1966 r. we Freiburgu, w wieku lat 81 — Hevesy podejmował i przeprowadzał wiele ciekawych i ważnych doświadczeń z izotopami, za co otrzymał liczne odznaczenia i nagrody. Poza nagrodą Nobla posiadał Medal Królewskiego Towarzystwa Chemicznego (jedyne nie Brytyjczyk obdarzony tą dystynkcją). W 1959 r. otrzy-

mał nagrodę w Stanach Zjednoczonych za zastosowanie energii atomowej do celów pokojowych. Był członkiem wielu towarzystw naukowych a honorowali go wszyscy, którzy mieli możliwość zetknąć się z nim osobiście.

LITERATURA

1. Hevesy G., *Radioactive Indicators, Their Application in Biochemistry, Animal Physiology and Pathology*, Interscience, New York, London 1948.
- Hevesy G., Hobbie R., *Z. Anal. Chem.* **88**, 1 (1932).
2. Hevesy G., Zechmeister L., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **53**, 410 (1920).
3. Hevesy G., Aten A. H. W., *Kgl. Danske Vid. Selsk. Biol. Med.* **14**, 5 (1939).
4. Hahn L., Hevesy G., *Nature* **145**, 549 (1940).
5. Hevesy G., *Biochem. J.* **17**, 439 (1923).
6. Christiansen J. A., Hevesy G., Lomholt S., *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **179**, 241 (1924).
7. Christiansen J. A., Hevesy G., Lomholt S., *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **178**, 1324 (1924).
8. Hevesy G., Wagner O., *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **149**, 336 (1930).
9. Hevesy G., Hofer E., *Nature* **133**, 495 (1934).
10. Hevesy G., Hofer E., *Klin. Wschrft.* **13**, 1524 (1934).
11. Hevesy G., Hofer E., *Nature* **134**, 879 (1934).
12. Hevesy G., Jacobsen C. F., *Acta Physiol. Scand.* **1**, 11 (1940).
13. Hahn L., Hevesy G., *Acta Physiol. Scand.* **1**, 347 (1941).
14. Chievitz O., Hevesy G., *Nature* **136**, 754 (1935).
15. Hevesy G., Baranowski T., Guthke A. J., Ostern P., Parnas J. K., *Acta Biol. Exptl Warszawa* **12**, 34 (1938).
16. Hevesy G., Parnas J. K., *Enzymologia* **5**, 136, 168 (1938).
17. Hevesy G., Ruysen R., Beeckmanns M. L., *Experientia* **7**, 144 (1951).
18. Hevesy G., *Exptl. Cell Res.* **3**, 192 (1952).
19. Hevesy G., *Naturwiss. Rdsch.* **8**, 380 (1955).
20. Hevesy G., *Adv. Biol. Phys.* **1**, 409 (1948).
21. Hevesy G., *Radioactive Indicators*, Interscience, N. Y. — London, 1948.
22. Hammarsten E., Hevesy G., *Acta Physiol. Scand.* **11**, 335 (1946).
23. Ahlstrom L., Euler H., Hevesy G., *Ark. Kemi.* **19**, 9 (1944).
24. Hevesy G., Ottesen J., *Acta Physiol. Scand.* **5**, 237 (1943).
25. Euler H., Hevesy G., *Ark. Kemi.* **17A**, 20 (1944).
26. Hevesy G., Forssberg A., 3rd Intern. Congr. Biochem. 1955.
27. Hevesy G., *Kgl. Danske Vid. Selsk. Biol. Med.* **22**, 9 (1955).
28. Hahn L., Hevesy G., Rebbe O. H., *Biochem. J.* **33**, 1549 (1939).
29. Hevesy G., Ottesen J., *Nature* **156**, 534 (1945).
30. Ehrenstein E., Hevesy G., *Acta Physiol. Scand.* **38**, 184 (1956).
31. Hevesy G., Hofer E., Krogh A., *Scand Arch. Physiol.* **72**, 199 (1935).
32. Hahn L., Hevesy G., *Acta Physiol. Scand.* **3**, 193 (1941).

Komunikaty

VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbędzie się w Olsztynie w dniach od 25 do 27 lipca 1968 roku. W ramach Zjazdu odbędzie się sympozjum na temat „*Biosynteza białka — struktura i funkcja makromolekuł i elementów subkomórkowych*” oraz obrady w sekcjach na tematy dowolne.

Bliższe informacje zostaną podane w osobnym komunikacie Komitetu Organizacyjnego Zjazdu.

V Zjazd FEBS odbędzie się w Pradze w dniach od 15 do 20 lipca 1968 roku.

Program Zjazdu obejmuje:

1. Sympozjum: Regulacje biochemiczne
 - a. hormony peptydowe
 - b. kontrola przez sprzężenie zwrotne
 - c. antymetabolity
2. Sympozjum: Immunochemia — struktura i funkcja γ -globulin
3. Kolokwium: Izoenzymy
4. Kolokwium: Metabolizm leków
5. Kolokwium: Transport przez błony lub mitochondria
6. Wolne doniesienia

RECENZJE

D. D. Mark i A. Zimmer: *Atlas of Clinical Laboratory Procedures.*

Vol. I. *Clinical, Chemistry* Wydawca: MacGraw-Hill Book Comp. New York, Toronto, Sydney, London. 1967. Stron 185.

Książka ta jest dość osobliwym podręcznikiem z zakresu biochemii klinicznej, bowiem przedstawia metody analityczne zarówno w formie opisowej, jak i ilustracyjnej. Można by oczywiście dyskutować, czy tego rodzaju forma książki upoważnia autorów do nazwania jej atlasem. Pomysł jest jednak oryginalny i na pewno przyczyni się do większego uprzyśtępnienia metod zalecanych przez autorów. Są one proste, łatwe do wykonania i zdały egzamin w wieloletniej praktyce.

Książka dzieli się na część ogólną omawiającą podstawowe zagadnienia z zakresu chemii analitycznej oraz na część metodyczną obejmującą opis metod stosowanych do badania różnych składników chemicznych przeważnie we krwi i w moczu. Sposób przedstawienia ich jest przejrzysty, zwięzły i uporządkowany, prawie schematyczny — typowy zresztą dla anglosaskich podręczników laboratoryjnych. Każdy opis zawiera: omówienie reakcji chemicznej, najczęściej również w formie wzorów, dane odnośnie próbki materiału, sposobu przygotowania odczynników i postępowania analitycznego, wartości prawidłowe oraz interpretację kliniczną, a ponadto piśmiennictwo.

Część ilustracyjną stanowią proste i instruktywne rysunki odpowiadające poszczególnym etapom postępowania analitycznego i wskazujące najwłaściwszy sposób jego wykonania. Dzięki temu książka staje się cennym podręcznikiem do nauki wykonywania analiz metody zostały bowiem nie tylko opisane, ale również pokazane.

Dobór analiz obejmuje najważniejsze badania ze stosowanych obecnie w laboratoriach szpitalnych i klinicznych. Można mieć jedynie zastrzeżenia odnośnie wyboru niektórych metod przez autorów. Na przykład oznaczanie bilirubiny metodą Jendrasika—Cleghorna—Grofa wydaje się dogodniejsze niż podana przez autorów metoda Malloya i Evellyna. Metoda oksydymetryczna Clarka i Collipa do oznaczania wapnia została już od dawna prawie wszędzie zastąpiona jedną z metod kompleksometrycznych lub kolorymetryczną z użyciem kwasu *p*-chloroanilinowego. Manometryczne oznaczanie CO₂ można zastąpić oznaczaniem kolorymetrycznym zasobu zasad. Na miejsce dość kłopotliwego do wykonania (w naszych warunkach) testu kefalinowo-cholesterolowego lepiej może byłoby podać jeden z bardziej dostępnych odczynów zmętnieniowych, na przykład odczyn Takata—Ary. Do oznaczania cholesterolu całkowitego wygodniejsza od polecanej przez autorów metody Lefflera jest metoda Pearsona, w której nie trzeba ekstrahować surowicy izopropanolem. Do oznaczania glukozy byłoby lepiej stosować prostą metodę z użyciem *o*-toluidyny, zamiast redukcyjnej metody Nelsona—Somogyi. Podobnie żelazo należałoby oznaczać nowoczesną metodą opartą na reakcji barwnej z bathofenantroliną. Dobrze byłoby też podać dla niektórych enzymów aktywność w milijednostkach międzynarodowych.

Poza drobnymi błędami drukarskimi (str. 30: dla roztworu standardowego bromu podano 100 g — zamiast 100 mg; str. 125: wytrząsanie 10 ml eteru z 1 ml 10% KI —

zamiast KJ) książka zredagowana jest bardzo starannie. Posiada format A3, a więc typowy dla atlasów. Rysunki zyskałyby może na estetyce, gdyby były nieco mniejsze. Książka stanowi oryginalną i cenną pozycję dydaktyczną w zakresie biochemii klinicznej.

Jan Hankiewicz

K. Lissak, E. Endrőci, *The Neuroendocrine Control of Adaptation*, Pergamon Press, 1965, stron 175.

Recenzowana monografia wraz z wykazem literatury i indeksem autorów obejmuje 175 stron oraz liczne oryginalne tablice i schematy. Monografia stanowiąca 25 pozycję sekcji: Nowoczesne Kierunki w naukach fizjologicznych międzynarodowej serii monografii w dziedzinie biologii czystej i stosowanej, zawiera dziewięć rozdziałów. Przedstawiono w nich obok krótkich danych anatomicznych o układzie przysadkowo-nadnerczowym, sekrecję hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) oraz hormonów kory nadnerczy przez organizm w stanie „spokoju” oraz „stres'u”, zdolności adaptacji ustroju do zmienionych warunków i rolę jaką w tym procesie odgrywa układ nadnerczowo-przysadkowy i inne gruczoły o wewnętrznym wydzielaniu (szczególnie tarczyca), regulację hormonalną uwalniania ACTH przez przysadkę, rolę systemu nerwowego w sekrecji ACTH przez przysadkę, zależności między układem przysadkowo-nadnerczowym a strefą funkcji płciowych oraz niektóre zagadnienia patologii wywołanej zaburzeniami równowagi między czynnością nerwową a funkcją układu przysadkowo-nadnerczowego.

Opracowanie poszczególnych rozdziałów tak pod względem nagromadzenia w nich wiadomości jak i treściowego ujęcia jest potraktowane przez autorów z nierównomierną uwagą. Na przykład rozdział o wydzielaniu hormonów kory nadnerczy, ich przemianie i regulacji jest objętościowo bardzo szczupły i podaje znacznie mniej wiadomości niż konwencjonalne podręczniki. Natomiast znacznie obszerniejszy jest rozdział o regulacji wydzielania ACTH przez przysadkę. Najobszerniej zaś i z uwzględnieniem najnowszych poglądów opracowany jest rozdział o wpływie podwzgórza i systemu nerwowego na funkcję układu przysadkowo-nadnerczowego. Szczególnie cenne są dane o odruchach warunkowych i funkcji układu przysadkowo-nadnerczowego w mechanizmie homeostazy. Autorzy próbowali stworzyć pomost między starą nauką Pawłowa a nowoczesnymi osiągnięciami w zakresie funkcji systemu nerwowego badanych za pomocą metod elektrofizjologicznych oraz sekrecji przysadki nadnerczy.

Wzajemną zależność między układami nerwowym i przysadkowo-nadnerczowym przedstawia również ostatni rozdział, w którym omówiono niektóre zagadnienia patologii związane z dyskorelacją tych układów. Zawiera on kliniczne obserwacje różnych stanów psychopatycznych, związanych z zaburzeniami sekrecji nadnerczy lub przysadki, między innymi schizofrenii i niektórych stanów padaczkowych. W rozdziale tym omówiono także wyniki badań nad zmianami w encefalogramie (EEG) występującymi po usunięciu zwierzętom nadnerczy i zanikającymi pod wpływem terapii hormonalnej oraz nad sekrecją przysadki i nadnerczy pod wpływem pobudzenia i hamowania układu nerwowego.

Autorzy przedstawili również doświadczenia własne oraz innych badaczy nad wpływem hormonów nadnerczowych i innych hormonów sterydowych na odruchy warunkowe oraz na ogólny „behavior” zwierząt. Sądzą oni, że takie badania pozwolą poznać i zrozumieć funkcje systemu nerwowego w mechanizmach homeostazy na tle środowiska zewnętrznego. Autorzy starają się być bardzo zwięzli, dążą do uogól-

nień przedstawianych poglądów i raczej unikają dyskusji nad nimi; jak również stawiania przed czytelnikiem problemów otwartych. Taki sposób ujęcia monografii określa równocześnie jej przeznaczenie i wybiera dla niej czytelnika. Dlatego też z dużym zainteresowaniem przeczyta omawianą książkę lekarz klinicysta oraz eksperymentator z zakresu pokrewnych dziedzin (fizjologii przemiany materii, termoregulacji, fizjologii „*behavioru*” oraz fizjologii reprodukcji).

E. Domański

Komunikat nr 5/67
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Nowy Zarząd Główny Towarzystwa został wybrany na Walnym Zebraniu w dniu 29 września 1967 roku. Skład Zarządu po ukonstytuowaniu przedstawia się następująco:

Prezes	— <i>prof. dr Zofia Zielińska</i>
V-Prezes	— <i>doc. dr Stefan Angielski</i>
Sekretarz	— <i>doc. dr Krzysztof Murawski</i>
Zastępca Sekretarza	— <i>doc. dr Konstancja Raczyńska-Bojanowska</i>
Skarbnik	— <i>doc. dr Włodzimierz Bicz</i>
Zastępca Skarbnika	— <i>dr Anna Mazanowska</i>
Pełnomocnik do Spraw Wydawniczych	— <i>doc. dr Tomasz Borkowski</i>
Pełnomocnik do Spraw Współpracy z innymi Towarzystwami Naukowymi	— <i>doc. dr Józef Lisowski</i>
Pełnomocnik do Spraw Zebrań i Zjazdów Naukowych	— <i>doc. dr Wacław Minakowski</i>
Pełnomocnik do Spraw Szkolenia i Popularyzacji	— <i>doc. dr Tadeusz Szczepkowski</i>
Członek Zarządu	— <i>dr Irena Szumiel</i>
Zastępcy Członków Zarządu	— <i>dr A. Dancewicz, doc. dr W. Drabikowski, dr H. Filipek-Wender, doc. dr L. Kłyszejko, doc. dr K. L. Wierzchowski</i>
Komisja Rewizyjna	— <i>prof. dr G. Bagdasarian, prof. dr W. Mejbaum-Katzenellenbogen, prof. dr K. Zakrzewski.</i>

Stałe dyżury Zarządu odbywają się w piątki w lokalu Towarzystwa przy ul. Freta 16 w godz. od 18-tej do 20-tej. Sprawy „*Monografii Biochemicznych*” oraz Kroniki „*Postępów Biochemii*” prowadzi *doc. dr T. Borkowski*, Lublin, ul. Lubartowska 85 — Katedra Chemii Fizjologicznej A M.

SPRAWOZDANIA

Biochemia w Parazytologii

Na marginesie IX Zjazdu Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego (Katowice 18-21.V.1967)

Poraz pierwszy w dziejach parazytologii polskiej wiodącym tematem Zjazdu PTP były dwa nowe, ściśle ze sobą związane kierunki: biochemii i immunologii pasożytów. Świadczy to o nowych tendencjach w tej dyscyplinie, która do niedawna jeszcze posługiwała się przede wszystkim metodami opisowymi. W pierwszym dniu obrad dr W. Kucharczyk, Doc. dr M. Skorczyński i Prof. dr J. Szaflarski (Katowice) wygłosili referat zespołowy na temat: „Niektóre współczesne problemy biochemiczne w parazytologii”, przedstawiając aktualny kierunek rozwojowy, a mianowicie stosowanie metod biochemicznych do rozwiązywania niektórych ważnych zagadnień w tej dyscyplinie. Kierunek ten obejmuje badania nad enzymami wewnątrzkomórkowymi samych pasożytów oraz nad biochemiczną odpowiedzią ustroju na zarażenie. Te ostatnie badania idą po dwu torach: pierwszy dotyczy wpływu inwazji pasożyta na szlaki metaboliczne żywiciela. Kierunek ten, czysto teoretyczny, w Polsce najintensywniej rozwijany w Ośrodku wrocławskim z inspiracji Prof. dr Z. Kozara przy ścisłej współpracy z Zakładem Prof. dr W. Mejbaum-Katzenellenbogen, obejmuje badania metabolizmu kwasów organicznych, przemiany tłuszczowej, cyklu Krebsa i innych. Drugi tor badań, praktyczny, dotyczy aktywności enzymów gospodarza w różnych okresach zarażenia. Różnice ilościowe i jakościowe mogą wskazać na charakter procesu a dynamika zmian — przybliżyć do oceny wartości stosowanego leczenia, co jest oczywistym *novum* w parazytologii. W referacie zastanawiano się również nad elementami warunkującymi dalszy rozwój tego kierunku parazytologii. Zaliczono do nich przede wszystkim sprawę napływu kwalifikowanej kadry biochemików. Referenci wskazali, że w Polsce na 47 placówek zajmujących się zagadnieniami parazytologicznymi tylko w 6 pracują wykwalifikowani biochemicy, to też większość prac o charakterze biochemicznym z konieczności wykonywana jest w ramach współpracy międzyzakładowej. Referenci są zdania, że należy podjąć zdecydowane kroki celem zabezpieczenia stałego dopływu tej kadry do parazytologii, w przeciwnym razie grozi zastój tego kierunku badań. Za drugi bardzo ważny element autorzy uznają dobór odpowiednich zwierząt doświadczalnych, zwłaszcza potrzebę prowadzenia doświadczeń na zwierzętach wolnych od określonej flory bakteryjnej (APF — *Specific Pathogen Free*) oraz zwierzętach jałowych (GF — *Germfree*). Czynniki bakteryjne i pasożytnicze występujące bądź to jako flora współżyjąca z ustrojem żywiciela i warunkująca jego prawidłowy metabolizm bądź też jako flora patogenna zaburzająca jego fizjologiczną równowagę wpływają bowiem na zmiany biochemiczne w ustroju gospodarza. Warto zaznaczyć, że w tym roku mija 30 lat od chwili kiedy N. Balzam opublikował swe historyczne już dzisiaj doświadczenia nad metabolizmem witamin u kurcząt hodowanych w warunkach jałowych. Było to pierwsze w Polsce doświadczenie przeprowadzone na odpowiednim materiale zwierzęcym. O znaczeniu tej sprawy świadczy fakt, że w ramach IX Zjazdu PTP odbyła się, pierwsza w Polsce, dyskusja „okrągłego stołu”

poświęcona problemom gnotobiologii, na którą przybyli: V-ce Prezes PAN Prof. Dr W. Stefański, Sekretarz Naukowy Wydz. II PAN Prof. dr A. Drozdowicz oraz przedstawiciel Polski w „ICLA” dr A. Drząszcz. Uczestnicy dyskusji obejrzelili kilka ciekawych filmów z tego zakresu oraz oryginalną aparaturę do hodowli zwierząt jałowych.

Ogółem na Zjazd wpłynęły 22 komunikaty zakwalifikowane do Sekcji Biochemicznej. Z pośród ważniejszych wymienić należy grupę referatów dotyczących biochemii włósnicy. Ozierieckowskaja (Moskwa) przedstawiła wyniki zespołowych prac nad biochemiczną predyspozycją larw włósnicy do pewnych grup mięśniowych. Zagadnieniu odpowiedzi tkankowej na zarażenie larwami tego samego pasożyta poświęcony był referat Prof. dr Zarzyckiego i wsp. (Wrocław). Autorzy stwierdzili, że pod wpływem zarażenia włósnicami zaatakowane włókna mięśniowe znacznie silniej wbudowują ^{32}P , przy czym udział jąder komórkowych w tym procesie sugeruje pewną rolę kwasów nukleinowych. Interesujące było również zaobserwowane wbudowywanie ^{32}P do włókien nerwowych w rejonie mięśni zaatakowanych przez włósnicę. Rozmieszczenie polipeptydów i glikoproteidów w włóknach mięśniowych w doświadczalnej włósnicy omówili Prof. dr W. Mejbaum-Katzenellenbogen i inni (Wrocław). Stwierdzili oni, że w zarażonej tkance mięśniowej pojawia się duża grupa substancji białkowych tworzących wyraźną, elektroforetycznie odrębną frakcję (F-4). Odczyny histo- i cytoenzymatyczne w doświadczalnej włósnicy omówili w 2 doniesieniach Prof. dr Z. Kozar i Dr Seniuta (Wrocław) zwracając uwagę, że odczyny cytoenzymatyczne w pasożycie są znacznie silniejsze aniżeli w otaczających włóknach mięśniowych i podkreślając znaczenie zachowania się szeregu dehydrogenaz i reduktaz. Dr Seniuta (Wrocław) stwierdziła także wzrost aktywności szeregu specyficznych fosfataz. Aktywność enzymów w surowicy krwi chorych na włósnicę omówił w swym referacie dr Dziewit i wsp. (Chorzów) a także dr T. Kozak (Zabrze). Doc. dr A. Ramisz i wsp. (Kraków) omówili wpływ „Tiguvonu” na aktywność esteraż cholinowych w doświadczalnej włósnicy oraz esteraż acetylocholinową u *Fasciola hepatica*. Stwierdzili oni, że układ nerwowy u *F. hepatica* jest typu cholinoergicznego, a rozrodczość pasożytów jest w dużej mierze uwarunkowana aktywnością tego enzymu. Proponowano przyjąć aktywność esteraży acetylocholinowej jako wskaźnik skuteczności niektórych związków organicznych fosforu w zwalczaniu robaków pasożytniczych. Badania Doc. dr M. Skorczyńskiego i wsp. (Katowice) oraz dr A. Minor i wsp. (Zabrze) dotyczyły zachowania się szeregu enzymów w przebiegu zarażenia pasożytem *Lamblija intestinalis*. Na podstawie aktywności enzymów oceniali oni wyniki postępowania leczniczego. Drugą grupę badań stanowiły doniesienia z dziedziny biochemii pasożytów. Dr J. Kubiśtowa i wsp. (Praga) przedstawili interesujące wyniki dotyczące związków fosforowych, a zwłaszcza fosforanów adenosyny i fosfagenów u szeregu robaków. Badania te stanowią część systematycznych badań prowadzonych przez dr Kubiśtovą w ośrodku praskim. Doc. dr T. Niebroj i dr Z. Wojdała (Katowice) omówili cytochemiczną strukturę pierwotniaka *Toxoplasma gondii*. Stwierdzono, że ten niebezpieczny pasożyt jest względnie beztlenowcem o cytoplazmie bardzo zróżnicowanej pod względem rozmieszczenia i aktywności wielu enzymów. Dr N. P. Łukaszenko i wsp. (Moskwa) przedstawili obserwacje nad cytochemiczną lokalizacją enzymów u *A. multilocularis* (Leuckart, 1863). Dr Łukaszenko mówił też o lokalizacji DNA oraz zmianach ilościowych glikogenu w zależności od fazy rozwojowej pasożyta. Dr Cz. Jabłonowska (Olsztyn) omówiła wpływ stresu parazytogenego i awitaminozy C na poziom kwasorozpuszczalnych frakcji fosforowych. Doc. dr A. Guttowa (Warszawa) przedstawiła zmiany zawartości różnych aminokwasów w płynach celomacyjnych u *Eudiotomus gracilis* pod wpływem obecności larw *Triaenophorus nodulosus*. Autorka stwierdziła, że zakażenie oczlików pociąga za sobą znaczny spadek ilości wolnych aminokwasów oraz powoduje przesunięcia w ich składzie. Pod-

sumowując obrady sekcji biochemicznej Prof. dr J. Szaflarski zwrócił uwagę nie tylko na fakt systematycznej penetracji biochemii do różnych dyscyplin nauk ścisłych, ale także na duże znaczenie tych badań dla dalszego rozwoju parazytologii. Ogromne zainteresowanie parazytologów biochemią jest jeszcze jednym — wciąż nie wszędzie docenianym — dowodem uniwersalizmu biochemii w naukach biologicznych. Opublikowanie tej krótkiej notatki w *Postęпах Biochemii* przyczyni się napewno do zwrócenia większej uwagi biochemików na nowe możliwości i kierunki działania.

W. Kucharczyk

SPIS TREŚCI

N. Wołosowicz, L. Jaroszewicz i S. Niewiarowski — Biochemia układu fibrynolitycznego osocza krwi	3
J. Kwiatkowska — Budowa hemoglobiny i jej związek z funkcją	27
K. Konopka — Defekty enzymatyczne krwinek czerwonych	49
A. J. Hłyńczak i J. Sysa — Methemoglobina i jej redukcja w krwinkach czerwonych	65
M. G. Sarzała — Trawienie i wchłanianie trójglicerydów	73
M. Skonieczna, I. Sopata, J. Wize i E. Wojtecka-Łukasik — Aktualne poglądy na strukturę i własności kolagenu	85
W. Ardelt — Molekularne uszkodzenia elastyny i kolagenu w latyryzmie i niektórych innych schorzeniach tkanki łącznej	105
D. Kruze — Występowanie hydroksyproliny w organizmach ssaków i jej wydalanie w moczu	119
J. Hankiewicz — Metody automatyczne w biochemii klinicznej z zastosowaniem autoanalyzerów	133
W. Ostrowski — George Hevesy, twórca metod izotopowych w badaniach biochemicznych	149
Recenzje książek (<i>J. Hankiewicz, E. Domański</i>)	155
Biochemia w parazytologii, na marginesie IX Zjazdu Polskiego Towarzystwa parazytologicznego, Katowice, 1967 (<i>W. Kucharczyk</i>)	159

W 2-gim zeszycie 14 tomu ukażą się

1. Współzależność oddychania mitochondrialnego i glikolizy cytoplazmatycznej, *J. Bryła, B. Frąckowiak*
2. Współczesne poglądy na mechanizm konwersji β -karotenu do witaminy A, *A. Gronowska-Senger*
3. Postępy badań nad cytokininami, *A. Szwejkowska*
4. Przydatność metody mikrobiologicznej do badań nad regulatorami wzrostu roślin, *M. Michniewicz*
5. Alkaloidy *Catharanthus roseus* G. Don. — nowa grupa związków biologicznie czynnych, *S. Kohlmeier*
6. Współzależność metaboliczna pomiędzy wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi w organizmie zwierzęcym, *J. Barańska*
7. Wpływ częstotliwości podawania pokarmu na przemianę materii, *W. Roszkowski*
8. Allosteryczna kontrola aktywności biologicznej niektórych białek, *B. Grzelakowska-Sztabert, J. Rytko*
9. Automatyczne metody oznaczania aminokwasów oparte na kolumnowej chromatografii jonowymiennej, *J. Kowalczyk, J. Warchalewski*
10. Porównanie klasyfikacji i terminologii enzymów Międzynarodowej Unii Biochemicznej z poprzednią klasyfikacją i terminologią, *T. Korzybski*

POSTĘPY BIOCHEMII

January 1968

ARTICLES IN POLISH

Volume 14

Number 1

N. Wołosowicz, L. Jaroszewicz, S. Niewiarowski — The Biochemistry of Fibrinolytic System of Blood Serum (Dep. Physiol. Chem. Med. School, Białystok)	3
J. Kwiatkowska — The Structure of Haemoglobin and its Correlation with Function (Dep. Physiol. Chem. Med. School, Wrocław)	27
K. Konopka — Enzymatic Defects of Red Cells (Blood Transf. Center, Łódź)	49
A. J. Hłyńczak, J. Sysa — Methaemoglobin and its Reduction in the Red Blood Cells (Dep. Physiol. Army Med. School, Łódź)	65
M. G. Sarzała — Digestion and Absorption of Triglycerides (Dep. Biochem. Inst. Exp. Biol. PAN, Warszawa)	73
M. Skonieczna, I. Sopata, J. Wize, E. Wojtecka-Łukasik — The Actual View on the Structure and Properties of Collagen (Dep. Bioch. Med. School, Warszawa and Dep. Bioch. Inst. Rheumatol. Warszawa)	85
W. Ardelt — The Molecular Alteration of Elastin and Collagen in Lathyrism and in Some Other Connective Tissue Diseases (Dep. Biochem.; Inst. Rheumatol., Warszawa)	105
D. Kruze — The Occurrence of Hydroxyproline in Mammalian Organisms and its Excretion in Urine (I Clin. Intern. Dis. Army Med. School, Warszawa)	119
J. Hankiewicz — Automatic Methods in Clinical Biochemistry with Use of the Autoanalyzer (I Clin. Intern. Dis. Med. School, Katowice)	133
W. Ostrowski — George Hevesy (Dep. Physiol. Chem. Med. School, Kraków)	149
Chronicle	155

Należy podawać kolejno: L.p., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginale), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., *J. Biol. Chem.* 202 793 (1953). Wykaz skrótów tytułów czasopism podają *Post. Biochem.*, 7 601 (1961). Cytując książki należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora(ów), tytuł, miejsce i rok wydania; np.: Przyłęcki S. J., *Podręcznik Chemii Fizjologicznej*, Łódź, 1947. Cytując artykuły w pracy zbiorowej należy podać po tytule tom i nazwiska wydawców, oraz na końcu stronicę; np. Schneider W. C., w *Methods in Enzymology*, tom III, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, New York 1957, str. 680.

SPIS TREŚCI

N. Wołosowicz, L. Jaroszewicz i S. Niewiarowski — Biochemia fibrynolitycznego osocza krwi	3
J. Kwiatkowska — Budowa hemoglobiny i jej związek z funkcją	27
K. Konopka — Defekty enzymatyczne krwinek czerwonych	49
A. J. Hłyńczak i J. Sysa — Methemoglobina i jej redukcja w krwinkach czerwonych	65
M. G. Sarzała — Trawienie i wchłanianie trójglicerydów	73
M. Skonieczna, I. Sopata, J. Wize i E. Wojtecka-Łukasik — Aktualne poglądy na strukturę i własności kolagenu	85
W. Ardelt — Molekularne uszkodzenia elastyny i kolagenu w łatyryzmie i niektórych innych schorzeniach tkanki łącznej	105
D. Kruze — Występowanie hydroksyprowliny w organizmach ssaków i jej wydalanie w moczu	119
J. Hankiewicz — Metody automatyczne w biochemii klinicznej z zastosowaniem autoanalizatora	133
W. Ostrowski — George Hevesy, twórca metod izotopowych w badaniach biochemicznych	149
Recenzje książek (J. Hankiewicz, E. Domański)	155
Biochemia w parazytologii, na marginesie IX Zjazdu Polskiego Towarzystwa parazytologicznego, Katowice, 1967 (W. Kucharczyk)	159